

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Diego Vinícius de Pontes Machado

**Avaliação comparativa da segurança
hepática e cardíaca do potencial fármaco
antichagásico hidroximetilnitrofural
(NFOH) com nitrofurazona (NF) em
coelhos.**

Araraquara
2013

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Diego Vinícius de Pontes Machado

**Avaliação comparativa da segurança hepática
e cardíaca do potencial fármaco antichagásico
hidroximetilnitrofural (NFOH) com
nitrofurazona (NF) em coelhos.**

Trabalho de Conclusão de Curso na área de Toxicologia apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como requisito para obtenção do Grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Orientação: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara
2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcos e Elsa, por todo esforço e dedicação oferecidos ao longo dos anos para que eu pudesse alcançar esse objetivo;

À minha família, sempre presente e unida mesmo nos momentos turbulentos;

À Isabela, que ao longo do caminho se tornou mais que uma amiga e companheira de todas as horas;

Aos meus amigos Elias, Marco, Michel, Marcelo e Luis Fernando, pela grande ajuda, disposição e conhecimento, oferecidos em inúmeros e seguidos dias de trabalho;

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini, pela oportunidade concedida e por contribuir de maneira ímpar para minha formação através de seus conselhos e ensinamentos.

Sumário

1. Introdução	8
1.1. Epidemiologia da Doença de Chagas	8
1.2. Infecção e patogenia	9
1.3. NFOH – nova alternativa à terapêutica	11
1.4. Estudos pré-clínicos	15
2. Objetivos	17
3. Desenvolvimento	18
3.1. Materiais e Métodos	18
3.1.1. Modelo Experimental	18
3.1.2. Cálculo de dose	19
3.1.3. Coleta e processamento de amostras	20
3.1.4. Eutanásia dos animais utilizados	21
3.1.5. Análise dos parâmetros bioquímicos	22
3.1.6. Análise de AST e ALT	22
3.1.7. Análise de bilirrubina	23
3.1.8. Análise de GGT.....	23
3.1.9. Análise de CK-MB	24
3.1.10. Análise Estatística	24
3.2. Resultados e Discussão	26
3.2.1. Curvas de calibração para AST e ALT	27
3.2.2. AST e ALT dos animais expostos	29
3.2.3. Bilirrubina dos animais expostos	34
3.2.4. GGT dos animais expostos	36
3.2.5. CK-MB dos animais expostos	38
4. Conclusão	41
5. Referências	42
6. Anexo	49

RESUMO

A tripanossomíase americana – Doença de Chagas – é uma parasitose típica de países tropicais e subdesenvolvidos. Devido a grande abrangência da doença, somada a dificuldade encontrada pelos pacientes para adquirir os medicamentos, Chung *et al.* (1996) sintetizaram o pró-fármaco hidroximetilnitrofural (NFOH). Esse derivado do nitrofural (NF), em estudos preliminares, apresentou resultados significativamente superiores aos observados com benznidazol e nitrofural, disponíveis para a terapia convencional. O presente estudo teve como objetivo a avaliação preliminar do potencial de hepatotoxicidade e cardiotoxicidade do NFOH quando administrado a coelhos albinos. O protocolo experimental se deu através da avaliação da atividade sérica dos biomarcadores hepáticos AST, ALT, GGT e bilirrubina, e do cardíaco CK-MB. Os animais foram divididos em três grupos (n=5), que receberam NFOH, NF e o veículo DMSO duas vezes ao dia, durante 24 dias. Para realização das análises foram coletadas amostras de sangue a cada seis dias. Os testes foram realizados através de kits bioquímicos para diagnóstico (Labtest®). Os níveis de AST e ALT dos grupos expostos aos fármacos apresentaram significativa diminuição com relação ao grupo controle, a bilirrubina não apresentou alterações significativas, e a atividade sérica da GGT apresentou-se elevada tanto nos grupos NFOH e NF quanto no grupo controle. Foi observada alta mortalidade entre os animais expostos ao NF e os valores de CK-MB foram significativamente superiores aos valores de referência descritos em literatura, sugerindo dano cardíaco. Tendo como base tais resultados, concluímos que o pró-fármaco não originou prejuízos relacionados ao tecido hepático, porém com relação à cardiotoxicidade há necessidade de estudos posteriores.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Chagas, hidroximetilnitrofural, nitrofural, toxicidade.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST – Aspartato amino transferase.

ALT – Alanina amino transferase.

CK – Creatina Quinase.

CK-MB – Creatina Quinase-MB.

CO₂ – Dióxido de carbono.

DL₅₀ – Dose Letal 50%.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

FDA – Food and Drug Administration.

GGT – Gama – glutamil transferase.

IC₉₅ – Intervalo de confiança 95%.

NF – Nitrofural; Nitrofurazona.

NFOH – Hidroximetilnitrofural.

OMS – Organização Mundial da Saúde.

RNA – Ácido ribonucleico.

R² – Coeficiente de Determinação.

TGO – Transaminase Oxalacética.

TGP – Transaminase Pirúvica.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de absorbância, em triplicata, para confecção de curva de calibração para AST.	27
Tabela 2	Valores de Absorbância, em triplicata, para a confecção da curva de calibração para ALT.	28
Tabela 3	Comparação entre os valores de AST dos grupos Controle, NFOH e NF. Valores apresentados em média (IC95).	30
Tabela 4	Comparação entre os valores de ALT dos grupos Controle, NFOH e NF. Valores apresentados em média (IC95).	30
Tabela 5	Bilirrubina Direta – Grupos Controle, NFOH e NF. Valores apresentados em média (IC95).	35
Tabela 6	Bilirrubina Indireta – Grupos Controle, NFOH e NF. Valores apresentados em média (IC95).	35
Tabela 7	Bilirrubina Total – Grupos Controle, NFOH e NF. Valores apresentados em média (IC95).	35
Tabela 8	GGT – Grupos Controle, NFOH e NF. Valores apresentados em média (IC95).	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação das estruturas do NF e NFOH.	14
Figura 2	Mortalidade dos animais do grupo NF.	26
Figura 3	Curva de calibração AST.	28
Figura 4	Curva de calibração ALT.	29
Figura 5	Comparação dos valores de atividade sérica de AST entre os grupos Controle, NFOH e NF.	32
Figura 6	Comparação dos valores de atividade sérica de ALT entre os grupos Controle, NFOH e NF.	32
Figura 7	Comparação dos níveis de CK- MB entre grupos NFOH, NF e valor de referência.	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia da Doença de Chagas

Segundo dados recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas pela Doença de Chagas em todo o mundo, principalmente na América latina, onde a doença é endêmica. Ainda, mais de 25 milhões de indivíduos estão expostos ao risco de infecção pelo *T. cruzi*, principal agente etiológico da parasitose (WHO, 2012).

Os primeiros registros acerca da doença de Chagas datam de 1909, quando o cientista brasileiro Carlos Chagas realizou investigações pioneiras sobre a desconhecida parasitose muito comum em países de toda a América Latina. No momento, há cerca de 2.500.000 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* no Brasil (Amato Neto & Pasternak, 2009).

Infelizmente, mesmo nos dias de hoje, a Tripanossomíase Americana é tratada como doença negligenciada, se encontrando à margem dos investimentos das grandes indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento de novas moléculas (Urbina, 2010).

Com prevalência observada na América Latina de uma maneira geral, essa enfermidade obteve algum avanço recente no que diz respeito ao controle vetorial da doença, mesmo que alguns países ainda sofram com a falta de vigilância epidemiológica e de sustentabilidade de programas de controle descentralizados (Hashimoto e Yoshioka, 2012).

Antes restrita a países subdesenvolvidos e intimamente relacionada a condições precárias de vida e habitação, hoje a doença de Chagas ganhou proporções globais devido ao intenso movimento migratório das áreas rurais para as

idades, largamente observado principalmente na América latina entre os anos 70 e 80. Ainda, sua distribuição atingiu cidades na América do Norte e Europa, levada por imigrantes das áreas endêmicas (Pereira Nunes *et al.*, 2013).

Devido a sua grande incidência sob uma parcela da população mundial, a doença têm se apresentado como um problema de ordem econômica tanto nas áreas endêmicas quanto no resto do mundo. Dentre os principais problemas verificados, podem-se destacar as complicações clínicas causadas pela doença, como cardiomiopatia, falência cardíaca, megaesôfago e megacólon, que demandam tratamentos caros e levam à incapacidade do indivíduo infectado. Os gastos globais com o tratamento das complicações da doença de Chagas durante um ano são estimados em cerca de 7,19 bilhões de dólares (Lee *et al.*, 2013).

Coura e Borges-Pereira (2012) destacaram entre os principais problemas relacionados à doença de Chagas a necessidade de se conhecer mais amplamente a patogenia e os padrões evolutivos da doença, além do desenvolvimento de um fármaco que possa ter utilização clínica tanto na fase aguda quanto crônica, e a priorização de programas de controle da enfermidade em países do continente sul americano e México, evidenciando a necessidade de investimentos maciços em estudos acerca dessa parasitose subtropical.

1.2. Infecção e patogenia

A doença é transmitida por insetos da família *Reduviidae*, incluindo as espécies *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*. A infecção pelo *T. cruzi* ocorre a partir do momento em que esses protozoários são depositados pelo vetor e entram em contato com mucosas ou, ainda, com lesões cutâneas do hospedeiro vertebrado. A transmissão vetorial é a principal forma de

contágio da doença, ocorrendo através da picada do triatomíneo que, ao ingerir o sangue da vítima, deposita suas fezes em um local próximo da ferida. Este processo provoca irritações no local que somadas às fezes contaminadas pelo parasita proporcionam a sua penetração no organismo.

Outras formas de infecção pelo *T. cruzi* envolvem a transfusão sanguínea de pessoas infectadas ou o transplante de órgãos. Ainda, há possibilidade do aparecimento da doença de Chagas congênita, quando mulheres grávidas infectadas transmitem a doença de maneira direta para o filho. Recentemente, evidenciou-se uma rota não comum de transmissão do mal de Chagas, através da ingestão de bebidas e comidas contaminadas com fezes dos triatomíneos que carregam o parasita. Acidentes laboratoriais também podem ser apontados como possíveis causas de contaminação (Salomon, 2011; WHO, 2012).

De uma maneira geral, a doença pode ser dividida em duas fases distintas – aguda, e crônica. A fase aguda é caracterizada pelo grande número de parasitas circulantes, que podem infectar uma ampla variedade de tecidos. Essa fase é relativamente curta em humanos – dura cerca de dois meses – e logo o quadro tende a evoluir para uma fase crônica assintomática, caracterizada pela baixa parasitemia e responsável por aproximadamente 50%-70% dos doentes. Num terceiro estágio da doença o indivíduo parasitado pode apresentar sintomatologia que envolve cardiopatias, megacólon ou megaesôfago. Técnicas de laboratório mais sensíveis têm sido empregadas no monitoramento da doença e apontam que os parasitas têm o hábito de se esconder profundamente no coração e outros tecidos, de modo que circulam em baixo número no sangue, esse período coincide com a fase crônica da doença (Fuentes *et al*, 2012).

De acordo com Pinazo *et al.* (2013), nos dias de hoje, a infecção pelo *T. cruzi* também tem sido caracterizada como oportunista em pacientes imunossuprimidos ou em tratamento com medicamentos imunossupressores, os quais podem apresentar reativação da Doença de Chagas sob essas condições. A reativação é caracterizada como um aumento da parasitemia mesmo na ausência de sintomas clínicos, sendo que os sintomas mais comuns da reativação são nódulos subcutâneos, miocardites, febre, meningites, encefalites e infarto.

Ainda, há a crescente relação da Doença de Chagas com o surgimento de neoplasias em pacientes infectados. De acordo com a literatura pouco se sabe sobre a relação entre as doenças neoplásicas e a infecção pelo *T. cruzi*, ou sobre como a resposta imune induzida pela parasitose altera o desenvolvimento das neoplasias. Essa relação tem sido estudada sob três diferentes perspectivas: A primeira seria a doença neoplásica como uma potencial causa de imunossupressão e consequente reativação da infecção; a segunda seria o surgimento das neoplasias em decorrência do tratamento com fármacos como o benznidazol, combinados ou não com drogas imunossupressoras; e a terceira seria a neoplasia como uma condição de maior incidência sobre os indivíduos infectados (Pinazo *et al.*, 2013)

1.3. NFOH - nova alternativa à terapêutica

Desde a sua descoberta, a Doença de Chagas já apresentou diversas fases na busca por moléculas eficientes e que pudessem compor uma terapia adequada para a parasitose. De 1936 a 1960, uma infinidade de substâncias químicas, extratos e misturas foram submetidos a testes clínicos e de avaliação biológica, que apresentaram resultados controversos e, na maioria das vezes, inexpressivos (Andrade *et al.*, 1996) .

De acordo com Raether & Hanel (2003), os resultados mais expressivos apontam para alguns derivados do 5- e 2-nitroimidazol e do 5-nitrofurano, como o benznidazol, nifurtimox, furazolidona, metronidazol, secnidazol, ornidazol e tinidazol.

Posteriormente, novos trabalhos apontaram a molécula de Nitrofurazona (NF) como alternativa para o tratamento, mesmo que tal molécula ainda necessitasse de novos estudos a fim de comprovar seu bom desempenho no tratamento da doença (Dias *et al*, 2009).

Mesmo com tais avanços no conhecimento da patologia e de algumas novas vertentes para o tratamento terem surgido com os anos, a Doença de Chagas ainda esbarra na falta de incentivo para as pesquisas, bem como no pouco interesse de grandes indústrias farmacêuticas em financiar o desenvolvimento de novas moléculas voltadas para enfermidades que afligem uma parcela da população que dispõe de condições precárias de vida, além de graves problemas sócio-econômicos (Urbina, 2010).

Prova dessa falta de incentivo, se tratando especificamente da Doença de Chagas, é que durante anos foi observada existência de apenas dois fármacos disponíveis no mercado: O Nifurtimox (Lampit®, Bayer) e o Benznidazol (Radanil®, Rochagan®, Roche) (Anandan, 1997; Tracy, 2001; Coura e Castro, 2002; Otero *et al*, 2006). No Brasil, atualmente apenas o benznidazol é comercializado, sendo produzido através de uma iniciativa público-privada pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (Lafepe) desde que a Roche anunciou a retirada de seu produto do mercado em virtude da baixa rentabilidade. O Lafepe é o hoje o único fabricante mundial do medicamento e atende, além do Brasil, países da América Latina e África (Governo do Estado de Pernambuco, 2013). O Nifurtimox é um derivado do 5-nitrofurano, lançado no Brasil com o nome comercial de Lampit®. Hoje, contudo, sua

utilização é restrita aos Estados Unidos, visto que as cepas brasileiras passaram a desenvolver resistência ao fármaco (Coura, 2009). Não bastassem tais empecilhos, ambos os fármacos apresentam elevada incidência de efeitos adversos, além de terem efeitos próximos aos desejados apenas na fase aguda da doença (Urbina, 2003).

A nitrofurazona (5-nitro-4-furaldeído-semicarbazona), ou Nitrofurazol (NF), é um nitrofurano pioneiramente testado contra a Doença de Chagas por Packchanian em 1952 e 1957, que despontou como uma interessante alternativa a terapêutica convencional. Nesses estudos, ratos infectados com *T. Cruzi* foram tratados com NF por via oral durante 53 dias, onde recebiam uma dose diária de 100 mg/kg. Como resultado 95,4% dos animais tratados foram curados, o que significa um resultado bastante importante. Assim, o NF foi considerado uma molécula promissora para a terapia da tripanossomíase americana. A partir daí inúmeros testes com o NF na fase aguda da doença tiveram início, contando com bons resultados clínicos (Coura e Castro, 2002).

A utilização de fármacos nitrofurânicos na terapêutica pode esbarrar em seu potencial carcinogênico e mutagênico, provavelmente ligados a presença de dois grupamentos com potenciais reativos: o grupo nitro na posição 5 e os grupos substituintes na posição 2 do anel furânico (Bosquesi *et al.*, 2008).

Em 1996, Chung *et al.* utilizou uma técnica de modificação molecular denominada “latenciação” para converter o Nitrofurazol num transportador hidroximetilado sem atividade biológica, mas que no organismo, através de reações químicas e/ou enzimáticas, é transformado novamente no fármaco matriz. Tal transportador, chamado “pró-fármaco” devido as suas características de síntese e conversão biológica, é o NFOH.

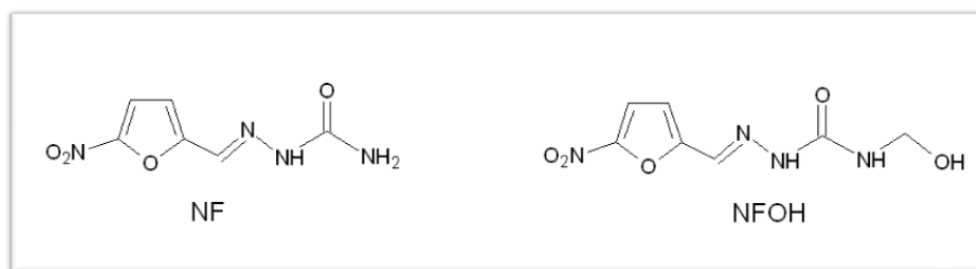


Figura 1 – Representação das estruturas do NF e NFOH.

O NFOH, posteriormente, foi submetido a testes de mutagenicidade, uma vez que o grupo nitro presente na molécula é potencialmente reativo, o que poderia ser causa de genotoxicidade, se tornando um grande empecilho na continuidade das pesquisas. Os resultados de tais ensaios, realizados através da indução de mutações gênicas em linhagens de *Salmonella typhimurium*, no entanto, foram bastante animadores, visto que a molécula apresentou mutagenicidade quatro vezes menor que a de seu fármaco matriz, NF (Güido *et al.*, 2001).

Testes de toxicidade aguda (14, 28 e 60 dias) realizados em camundongos e ratos também sugeriram uma baixa toxicidade do NFOH quando comparado ao NF. A dose letal 50% (DL₅₀) do NF foi estimada em 556,3 mg/kg, ao passo que a do NFOH se mostrou superior a 2000 mg/kg, caracterizando o composto como pouco tóxico, segundo critérios da OMS (Melo, 2006).

Ensaio preliminares de atividade biológica do NFOH foram realizados em cultura de epitélio renal de macacos *Rhesus* infectadas com *T. cruzi* na forma tripomastigota. Esses demonstraram que a atividade do NFOH foi maior que a do NF, a molécula matriz, e que a do benznidazol, medicamento utilizado na terapêutica (Bosquesi *et al.*, 2008).

A sua conversão gradual no fármaco matriz é um fator determinante na sua menor expressão de toxicidade, uma vez que haverá níveis de concentração plasmática reduzidos do fármaco no sistema biológico (Serafim, 2008).

Outros estudos, principalmente os conduzidos por Barbosa *et al.* (2007), apontam que o NFOH pode ser não somente um importante pró-fármaco do NF, mas também uma molécula com atividade própria contra o *Tripanossoma*. Quando incubada com cultura de células permeáveis infectadas com *T. cruzi* por um período de exposição de 20 minutos – tempo insuficiente para a conversão total em NF – o NFOH apresentou importantes resultados tripanomicidas. Isso sugere que o NFOH possa inibir o processamento de ácido ribonucleico (RNA) do parasita, através de uma interferência no processo de maturação no RNA mensageiro.

1.4. Estudos pré-clínicos

O estudo dos efeitos tóxicos de uma novo candidato a produto farmacêutico é uma das etapas mais importantes no seu desenvolvimento, considerando que estes efeitos podem ser limitantes para a utilização na terapêutica. Os estudos em fase pré-clínica são fundamentais para a avaliação risco - benefício, além de serem ferramentas essenciais para a previsão de possíveis efeitos tóxicos no organismo humano. De acordo com o FDA (1997), esses testes de avaliação de toxicidade devem ser conduzidos em pelo menos duas espécies de mamíferos, sendo uma não-roedora.

Tendo em vista tais fatores, e ainda a possibilidade de reunir informações suficientes para o prosseguimento dos testes com a nova molécula, no presente estudo realizou-se o estudo preliminar da hepatotoxicidade do pró-fármaco Hidroximetilnitrofural em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*), mamíferos não-

roedores. Para isso foram realizados testes bioquímicos, por meio da análise de marcadores hepáticos como Aspartato amino transferase (AST), Alanina amino transferase (ALT), gama – glutamil transferase (GGT) e bilirrubina. Os valores obtidos durante o estudo foram comparados com um grupo controle, exposto ao veículo DMSO, e um grupo exposto ao fármaco matriz, NF.

2. OBJETIVOS

- Avaliação dos biomarcadores AST, ALT, GGT, bilirrubina e CK-MB de coelhos albinos que receberam dimetilsulfóxido (DMSO) diariamente;
- Avaliação dos biomarcadores AST, ALT, GGT, bilirrubina e CK-MB de coelhos albinos que receberam NFOH diariamente;
- Avaliação dos biomarcadores AST, ALT, GGT, bilirrubina e CK-MB de coelhos albinos que receberam NF diariamente;
- Análise dos resultados obtidos e comparação estatística entre os grupos previamente citados.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Modelo Experimental

Foram utilizados Coelhos Albinos, com peso entre 2 e 3 quilos, obtidos do Biotério Central da UNESP Botucatu. Esses animais foram transferidos e mantidos, durante toda a fase experimental, no biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia – PANT - da UNESP Araraquara em gaiolas individuais, providos de água e alimento à vontade. O biotério oferece condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 5\%$), além de sistema de iluminação automatizado, com ciclo de luz de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, acendendo diariamente às 07 horas da manhã.

O estudo obteve autorização para a utilização de animais em pesquisa junto a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, de acordo com o Protocolo CEP/FCF/Car nº 10/2011 - Parecer nº 15/2011 (em anexo).

Para a realização do experimento, os animais utilizados foram divididos em três grupos distintos (n=5 cada):

- Grupo Controle: Os animais receberam DMSO, 0,5 ml/kg, via gavagem, durante 24 dias, duas vezes ao dia, de 12 em 12 horas.
- Grupo NFOH: Os animais receberam NFOH, via gavagem, durante 24 dias, duas vezes ao dia, de 12 em 12 horas. Nos doze dias iniciais os animais receberam 76,8 mg/kg e nos 12 dias seguintes a dose de NFOH foi de 64,0 mg/kg.

- Grupo NF: Os animais receberam NF, via gavagem, durante 24 dias, duas vezes ao dia, de 12 em 12 horas. Nos 12 primeiros dias os animais receberam uma dose de 66,0 mg/kg e nos 12 dias finais a dose de NF foi de 55,0 mg/kg.

3.1.2. Cálculos de dose

A dose de NF foi calculada por extrapolação alométrica considerando-se a dose de 30 mg/kg nos primeiros 25 dias de tratamento e 25 mg/kg nos 25 dias posteriores proposta por Ferreira (1961) para o tratamento da Doença de Chagas no homem. Para o cálculo de NFOH considerou-se as relações de massa molecular com NF para a liberação da mesma quantidade do fármaco matriz na administração do pró-fármaco.

Os animais do grupo controle receberam DMSO na dose de 0,5ml/kg (0,55g/kg), por 24 dias, duas vezes ao dia. O DMSO foi o veículo de escolha para a solubilização do pró-fármaco e do fármaco matriz, em decorrência da insolubilidade em água. Assim, o mesmo veículo foi selecionado para a avaliação do grupo controle. Esta característica foi verificada em nosso laboratório, e já observada por Chung *et al.* (2003).

Serafim (2008) realizou ensaios de solubilidade com NF e NFOH e, segundo as diretrizes da farmacopeia brasileira, classificou os compostos como “muito pouco solúveis” ou “insolúveis” nos seguintes solventes: água, metanol, etanol, acetona, acetonitrila, propilenoglicol, tetrahidrofurano, ácido acético, butanol, álcool isopropílico e hidróxido de amônio. Nos solventes DMSO e dimetilformamida ambos foram classificados como facilmente solúveis. Em laboratório verificamos ainda a baixa solubilidade dos compostos em óleos vegetais comestíveis.

A administração via oral de DMSO puro foi avaliada por Wilson, Brown e Timmers (1965), onde se estabeleceu a DL₅₀ dessa substância em 21,4 g/kg para camundongos, e 28,3 g/kg para ratos – doses muito superiores às administradas no presente estudo. Ainda segundo Wilson, Brown e Timmers (1965), doses orais não-letais de DMSO produzem apenas decréscimo da atividade motora, polidipsia e poliúria.

Jacob e Wood (1967) relatou que coelhos que receberam DMSO por via oral numa dose de 10,0 g/kg por dia desenvolveram-se normalmente; as fêmeas tinham ninhadas normais e não apresentavam alterações macro ou microscópicas. Sendo assim, consideramos a administração de DMSO na dose de 0,55 g/kg para coelhos, muito abaixo da dose utilizada por Jacob e Wood (1967), como segura.

De acordo com Rand-Luby *et al*, (1996) a administração de DMSO pode ser considerada como segura e bem tolerada. Alves (1998) aponta que a toxicidade da substância, ao contrário do inicialmente divulgado, pode ser considerada baixa e que os efeitos adversos verificados não são expressivos. Ainda, sua excreção ocorre, principalmente, por via urinária. A via respiratória contribui com cerca de 3% do total da eliminação.

3.1.3. Coleta e processamento de amostras

Durante o período de execução do estudo, um grupo de animais recebeu DMSO, enquanto os outros grupos receberam NFOH e NF. Foram colhidas amostras de sangue, a partir da veia marginal da orelha, para a determinação dos parâmetros bioquímicos anteriormente ao início da exposição dos animais aos produtos. Posteriormente à primeira administração foram realizadas coletas de sangue a cada 6 dias, de modo que ao término do 24º dia foram obtidas 5 amostras

de sangue por animal – pré-exposição, 6º dia, 12º dia, 18º dia e pós-exposição (24º dia).

As amostras de sangue foram então devidamente identificadas de acordo com o animal, o grupo que pertenciam e o dia de exposição. O material permanecia então sob temperatura de 37° Celsius por uma hora, tempo suficiente para coagulação e retração do coágulo, e posteriormente era submetido à centrifugação em 2.500 rotações por minuto, por 10 minutos, para a obtenção do soro para análise. As amostras que não puderam ser analisadas imediatamente foram congeladas sob temperatura de -80° Celsius até a análise. Todas essas medidas foram realizadas de modo que pudesse ser minimizada a ocorrência de hemólise, fator que poderia prejudicar as medidas de absorbância durante a realização dos testes laboratoriais.

3.1.4. Eutanásia dos animais utilizados

Após o período de exposição e coleta de amostras, os animais utilizados pelo estudo foram submetidos à eutanásia por inalação de CO₂. Para isso, foram colocados em uma câmara isolada onde inalaram o gás proveniente de um cilindro até a detecção de parada respiratória. A partir daí, animais foram mantidos na câmara por mais dez minutos, garantindo assim a sua morte.

O emprego do CO₂ como gás para eutanásia se justifica pela redução dos efeitos irritantes nas vias aéreas, uma vez que o mesmo proporciona uma rápida anestesia, seguida de perda de consciência e morte. Esse gás possui uma rápida ação letal por provocar depressão no sistema nervoso central, além disso, não é inflamável nem explosivo e pode ser considerado seguro desde que aplicado com os equipamentos apropriados (Fiocruz, 2005).

3.1.5. Análise dos Parâmetros Bioquímicos

As enzimas utilizadas para a avaliação da função hepática dos animais nesse período foram a Alanina amino transferase (ALT), Aspartato amino transferase (AST), Gama-glutamil transferase (GGT) e bilirrubina. Alterações nos níveis de ALT, assim como de AST são indicativos de lesão nos hepatócitos; alterações nos níveis de GGT são sugestivos de colestase intra e extra-hepática (Burtis, Ashwood e Bruns 2006).

Se houver lesão de hepatócitos, bem como alteração em alguma de suas funções, a atividade plasmática dessas enzimas logo será aumentada, tornando-as um bom indicativo de disfunção, ou doença, hepática. Além disso, a determinação de bilirrubina e ácidos biliares constitui uma importante ferramenta para a avaliação das funções hepáticas como armazenamento, conjugação e secreção.

A CK-MB é uma enzima rapidamente liberada em caso de lesão muscular, principalmente na musculatura cardíaca, onde ocorre em altas quantidades quando comparada a outros tipos de células musculares. Lesões nessas células são acompanhadas de rápidos aumentos da atividade sérica dessa isoforma da CK.

3.1.6. Análise de AST e ALT.

As enzimas ALT e AST foram determinadas por método colorimétrico pela reação de Reitman-Frankel (Burtis, Ashwood e Bruns 2006), cujas etapas estão descritas a seguir:

- Aspartato amino transferase (AST ou TGO): A transaminase oxalacética promove a transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos.



- Alanina amino transferase (ALT ou TGP)- a transaminase pirúvica promove a transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos.



O piruvato e/ou oxalacetato formados reagem com a 2,4- dinitrofenil hidrazina com formação da hidrazona correspondente que absorve luz à 505nm, em meio alcalino, possibilitando assim sua dosagem.

3.1.7. Análise de Bilirrubina

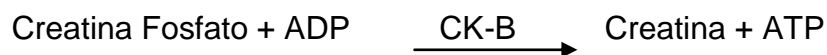
A bilirrubina foi determinada por diazotação e formação de azobilirrubina vermelha com absorção máxima em 525nm. A bilirrubina direta (diglicurônide) é determinada em meio aquoso, enquanto a total (direta e indireta) é determinada por potente solubilizador de ação catalisadora.

3.1.8. Análise de GGT

Para a determinação da GGT foi utilizado o método colorimétrico de Szaz modificado com absorção em 405 nm. A gama- glutamil transferase catalisa a transferência do grupamento Glutamil da L- γ Glutamil-p-nitroanilida para a glicilglicina, formando γ - Glutamil glicilglicina e p-nitroanilina. A p-nitroanilina é medida e é diretamente proporcional à atividade da enzima Gama GT.

3.1.9. Análise de CK- MB

A atividade da isoenzima MB da Creatina Quinase 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 através das reações adiante:



A atividade da CK- B na amostra é proporcional ao incremento da absorbância, em 340 nm.

3.1.10. Análise Estatística

- A comparação estatística dos parâmetros bioquímicos dentro de cada grupo – controle, NFOH e NF – foi realizada pela análise de variância de Friedman (ANOVA pareada não-paramétrica) seguida de Dunn;
- A comparação estatística dos parâmetros bioquímicos intergrupos foi realizada pela aplicação do teste de variância de Kruskal – Wallis (ANOVA não pareada não-paramétrica) seguida de Dunn.
- A comparação estatística dos parâmetros bioquímicos intergrupos de dois a dois (Controle *versus* NFOH) foi realizada através da aplicação do teste de variância de Mann – Whitney (não pareado não-paramétrico).

- O grupo NF, em decorrência da elevada mortalidade dos animais mostrada adiante (Figura 1), conta com amostras referentes apenas a Pré- exposição e sexto dia de exposição, portanto a comparação estatística dos parâmetros bioquímicos dentro deste grupo foi realizada através da aplicação do teste de Wilcoxon (pareado não-paramétrico).

As análises foram feitas utilizando os softwares SigmaStat e GraphPadInStat®. Os cálculos das curvas de calibração e coeficientes de variação (CV%) foram realizados utilizando-se o programa OriginPro®.

Foi considerado o nível de significância de 0,05.

3.2. Resultados e Discussão

A seguir estão descritos os resultados obtidos pelo presente trabalho. Durante sua execução, notamos que os animais referentes ao grupo NF não resistiam ao tratamento de modo que, ao final dos 24 dias de administração deste grupo, contávamos com apenas um animal, não possuindo assim dados suficientes para avaliação do grupo nem comparações estatísticas.

A figura 2 expõe a relação entre a mortalidade dos animais dos grupos NF e NFOH com os dias de administração do fármaco:

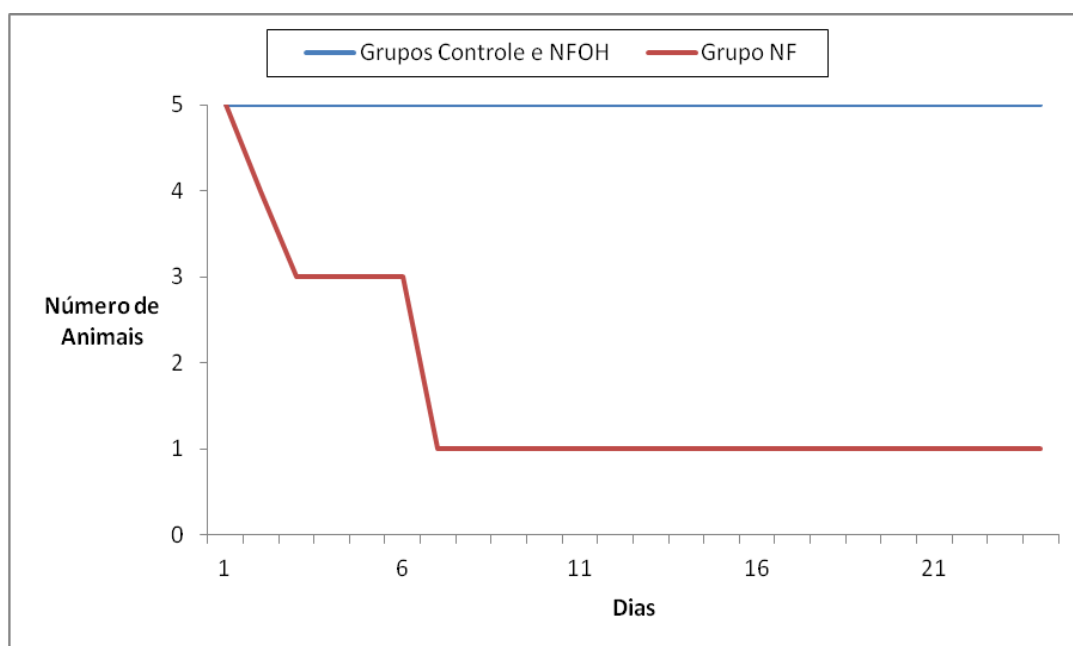


Figura 2 – Mortalidade dos animais do grupo NF.

Com base na figura 2 podemos observar que quase a totalidade dos animais expostos ao NF morreram antes que fosse atingido o 24º dia de administração. Dois animais morreram no período correspondente ao intervalo entre Pré-exposição e primeiro dia de coleta de amostras (sexto dia de exposição). Outros dois animais

morreram pouco tempo após o sexto dia de exposição. Dessa forma tornou-se impossível uma obtenção satisfatória de dados afim de se realizar análise do grupo NF, bem como comparação estatística com o grupo controle ou grupo NFOH, os quais não apresentaram mortalidade alguma entre os animais utilizados. Portanto, os resultados apresentados pelo presente estudo referem-se ao grupo controle, grupo NFOH e grupo NF Pré- exposição e 6º dia de exposição.

3.2.1. Curvas de Calibração para AST e ALT

Para uma correta interpretação das absorbâncias lidas no espectrofotômetro se faz necessária a construção de curvas de calibração. Essas curvas possuem valores de referência, que podem ser encontradas no manual do kit Labtest® específico, e executadas de acordo com o kit que venha a ser utilizado. Cada valor de referência é específico para a correta conversão da absorbância em unidades de atividade enzimática por litro de sangue. Para este experimento foram obtidos os seguintes valores, em triplicata, para as absorbâncias, que deram origem às curvas encontradas nas tabelas 1 e 2:

Tabela 1 – Valores de absorbância, em triplicata, para confecção de curva de calibração para AST.

Valor de referência (u/L)	AST				
	0	24	61	114	160
Abs 1	0,221	0,292	0,386	0,449	0,503
Abs 2	0,211	0,296	0,376	0,446	0,510
Abs 3	0,233	0,311	0,357	0,456	0,498
MÉDIA	0,221	0,299	0,373	0,450	0,503
Desvio Padrão	0,011	0,010	0,015	0,005	0,006
CV	4,984	3,350	3,949	1,140	1,198

Com as medidas de absorvância estabelecidas, e tomando os valores de referência correspondentes, construímos a curva de calibração para a enzima AST utilizando o software OriginPro®:

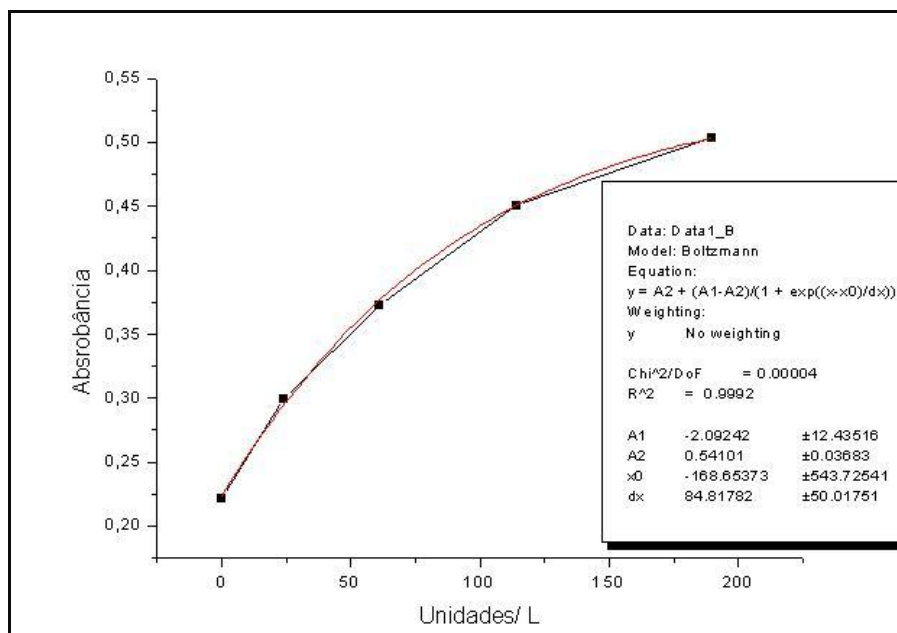


Figura 3 – Curva de Calibração AST.

Tabela 2 – Valores de absorvância, em triplicata, para confecção da curva de calibração para ALT.

ALT					
Valores de referência (u/L)	0	28	57	97	150
Abs1	0,230	0,321	0,372	0,446	0,530
Abs 2	0,221	0,306	0,390	0,447	0,507
Abs 3	0,235	0,305	0,388	0,470	0,508
MÉDIA	0,228	0,310	0,383	0,454	0,515
Desvio Padrão	0,007	0,009	0,010	0,014	0,013
CV	3,112	2,891	2,576	2,991	2,524

Utilizando os valores de referência estabelecidos para esta enzima, e tendo em mãos as medidas de absorbância, construímos também a curva de calibração para a enzima ALT utilizando o software OriginPro®:

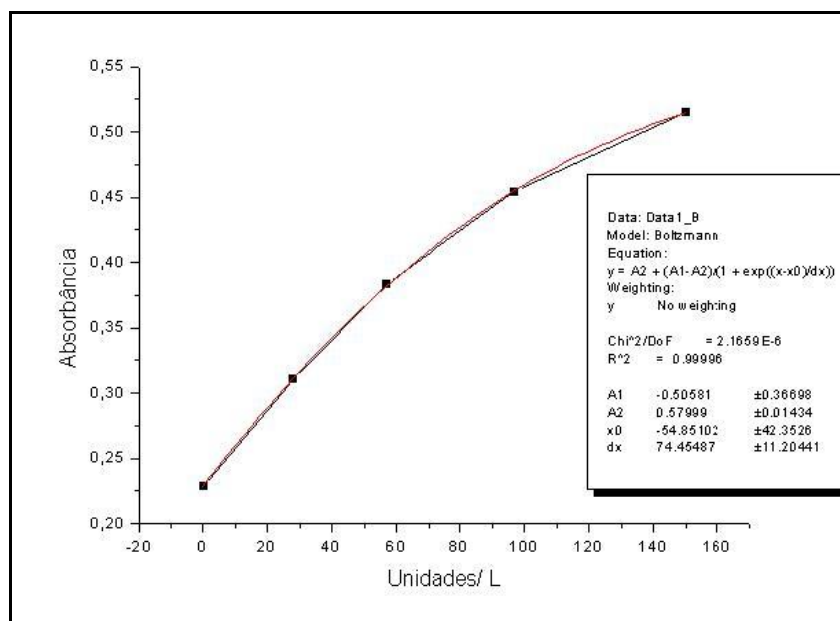


Figura 4 – Curva de Calibração ALT.

As duas curvas apresentaram altos coeficientes de determinação, $R^2 = 0,9992$ para a curva da AST, e $R^2 = 0,99996$ para a curva da ALT. Assim, sabemos que podemos utilizá-las seguramente para a obtenção de nossos resultados de maneira confiável para ambas as enzimas.

3.2.2. AST e ALT dos animais expostos

Com a obtenção das respectivas curvas de calibração, foi possível determinar os valores de atividade, em U/L, das enzimas AST e ALT correspondentes aos grupos controle, NFOH - Pré-exposição, 6º dia, 12º dia, 18º e pós-exposição – e grupo NF – Pré-exposição e 6º dia de exposição. As tabelas 3 e 4 adiante apresentam, respectivamente, os valores de AST e ALT medidos em cada um dos dias de coleta dos grupos:

Tabela 3 – Comparação entre os valores de AST dos grupos Controle, NFOH e NF. Valores apresentados em média (IC95).

AST					
	Pré - Exposição	Dia 6	Dia 12	Dia 18	Pós - Exposição
Controle	75,0 (58,98 – 91,01)	60,6 (36,92 – 84,27)	86,4 (63,16 – 109,64)	75,8 (49,62 – 101,98)	85,0 (20,86 – 149,13)
NFOH	34,2 (13,43 – 54,93)	49,4 (29,40 – 69,39)	24,6* (12,60 – 36,59)	34,2* (19,11 – 49,28)	32,0* (13,27 – 50,72)
NF	36,0 (5,01 – 66,98)	32,6* (24,68 – 40,65)	-	-	-

***(p<0,05) com relação ao Controle. Mann- Whitey.**

Tabela 4 – Comparação entre os valores de ALT dos grupos Controle, NFOH e NF. Valores apresentados em média (IC95).

ALT					
	Pré - Exposição	Dia 6	Dia 12	Dia 18	Pós - Exposição
Controle	61,4 (29,57 – 93,22)	54,8 (33,52 – 76,06)	98,8 (73,15 – 124,44)	92,0 (68,13 – 115,86)	93,8 (64,94 – 122,65)
NFOH	92,8 (55,60 – 130,00)	50,0 (24,61 – 75,00)	28,8*# (16,49 – 41,00)	43,4* (25,96 – 61,00)	32,2*# (19,58 – 45,00)
NF	78,0 (46,81 – 109,19)	35,0 (25,62 – 46,00)	-	-	-

*** (p<0,05) com relação ao Controle. Mann- Whitney.**

(p<0,05) com relação ao Pré- exposição NFOH. Friedman seguido de Dunn.

A AST, Aspartato Amino Transferase, também conhecida como TGO, catalisa a transaminação de L-aspartato para 2-oxoglutarato para formar oxalacetato e L-glutamato, com grande importância nos ciclos (Burtis, Ashwood e Bruns 2006).

Esta enzima 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. Quando observado grandes aumentos nas concentrações dessa enzima não

necessariamente significam toxicidade hepática, uma vez que a AST também está presente em grandes quantidades no tecido muscular e cardíaco. Assim, quando ocorre morte celular nestes tecidos também há grande aumento desta enzima no plasma sanguíneo. Não há métodos simples e diretos para determinar a origem deste resultado, portanto utiliza-se outras enzimas para confirmar o diagnóstico. Caso a alteração tenha origem hepática, deve-se quantificar também ALT, caso seja muscular o marcador CK pode auxiliar na interpretação (Burtis, Ashwood e Bruns 2006).

A ALT, também conhecida como TGP (transaminase pirúvica), é uma enzima que catalisa a transaminação da L-alanina para 2-oxoglutarato(2-cetoglutarato) formando piruvato e L-glutamato; o piruvato pode ser usado para a gliconeogênese além de ter papel importante no transporte de nitrogênio entre as células. Esta transaminase é encontrada principalmente no fígado e nos rins, variando de espécie para espécie, claro que por ser importante para todo o metabolismo, encontra-se em menor quantidade em outros tecidos. No caso da investigação de hepatotoxicidade, há interesse na presença desta enzima no citoplasma dos hepatócitos embora ela também possa ser encontrada em menor concentração nas mitocôndrias destas células. Quando há danos ao hepatócito, inicialmente são liberadas as enzimas do citoplasma destas células e, com a persistência do dano ou em caso de hepatotoxicidade aguda, são liberadas também as enzimas presentes nas mitocôndrias, em menor velocidade (Kaneko, Harvey & Bruss, 2008).

As figuras 5 e 6, apresentadas a seguir, contribuem para uma melhor visualização da variação dos níveis sorológicos das enzimas AST e ALT nos animais expostos.

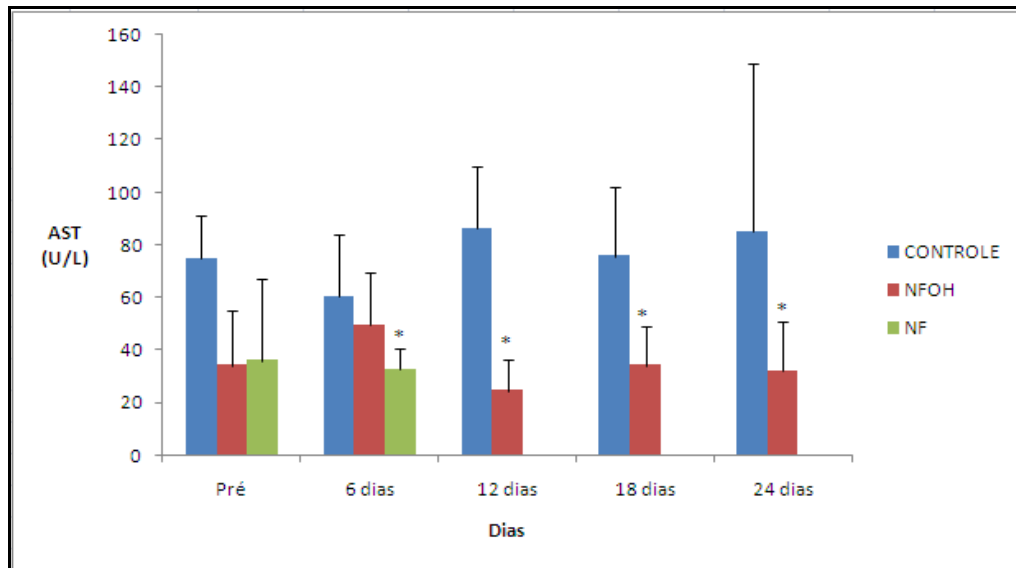


Figura 5 – Comparação dos valores de atividade sérica de AST entre os grupos Controle, NFOH e NF.

*($p < 0,05$) com relação ao Controle. Mann-Whitney.

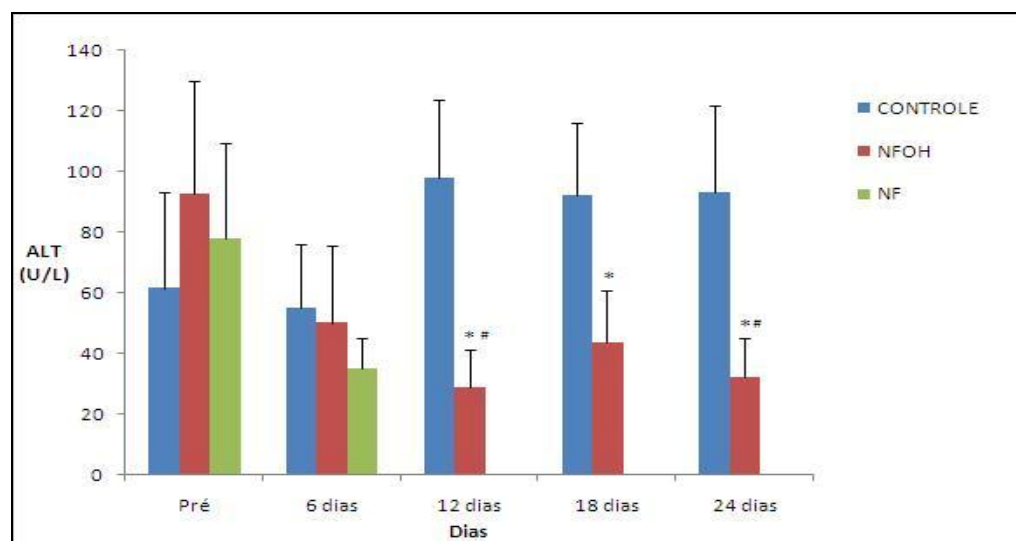


Figura 6 - Comparação dos valores de atividade sérica de ALT entre os grupos Controle, NFOH e NF.

*($p < 0,05$) com relação ao Controle. Mann-Whitney.

($p < 0,05$) com relação ao Pré-exposição NFOH. Friedman seguido de Dunn.

Os resultados não apontaram diferenças significativas nos níveis de AST e ALT referentes à pré-exposição dos animais, desse modo é possível concluir que partimos de animais considerados normais, semelhantes nos níveis dessas enzimas antes da exposição ao DMSO (grupo controle), NFOH e NF.

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 3 e 4, e ainda nas figuras 5 e 6, podemos observar significativas diminuições dos níveis de AST e ALT no grupo NFOH a partir do 12º dia de exposição, quando comparado ao grupo controle. Ainda no grupo NFOH, podemos observar significativa diminuição nos níveis de ALT referentes ao 12º dia e Pós-exposição dos animais com relação à Pré-exposição ao fármaco.

No grupo NF uma significativa diminuição nos níveis de AST foi observada de maneira mais precoce, no 6º dia de exposição, e a partir de então os animais não resistiram ao tratamento. Apesar da diminuição significativa, tais valores se encontram dentro da faixa de normalidade esperada para coelhos albinos, não indicando alterações relevantes no perfil de hepatotoxicidade dos fármacos.

Yu *et al.*, 2009, apontou que os valores de AST para coelhos albinos variavam numa faixa de 29,0 a 75,0, enquanto os valores de ALT para esta espécie de animais variavam numa faixa de 37,0 a 95,0. De acordo com esses valores podemos concluir que os fármacos utilizados no presente estudo não causaram alterações importantes no que diz respeito a esses marcadores, nem para mais, nem para menos.

Melo, 2006, realizou estudo de toxicidade hepática em múltiplas doses em camundongos. Após 28 dias de tratamento seus resultados não apontaram diferenças significativas nos valores das enzimas AST e ALT no soro dos camundongos que receberam NFOH em doses de 100mg/kg e 200mg/kg, quando comparados a um grupo de animais que recebeu DMSO. Esses valores se encontravam, em sua totalidade, dentro da faixa de normalidade descrita na literatura.

Tendo como base os resultados obtidos por Melo, 2006, e levando em consideração a significativa diminuição nos níveis de AST e ALT, dentro da faixa de normalidade, verificadas no presente trabalho, podemos concluir que a administração de NFOH em múltiplas doses não altera os níveis dos marcadores hepáticos AST e ALT em coelhos albinos de modo importante o suficiente para ser indicativo de lesão hepática.

3.2.3. Bilirrubina dos animais expostos

A bilirrubina é um pigmento encontrado na bile, fundamental para diversos aspectos do metabolismo. A bilirrubina conjuga-se com fármacos que participam do ciclo entero-hepático e possui função de extrema importância na formação das fezes e absorção de nutrientes. Na circulação pode ser encontrada de duas formas: da forma direta, sem estar conjugada ou da forma indireta que é quando está conjugada com alguma proteína ou molécula, normalmente a albumina. A avaliação de seus níveis plasmáticos é interessante para verificar danos ao fígado geralmente ligados à obstrução do ducto biliar (Kaneko, Harvey & Bruss, 2008).

A bilirrubina é detectada geralmente pelo método de van der Bergh, ou reação Diazo, e neste caso podemos diferenciar-se a Bilirrubina direta da bilirrubina total. Isso ocorre porque a bilirrubina não conjugada, ou bilirrubina direta, é solúvel em água e conjuga-se prontamente ao reagente Diazo composto por ácido sulfanílico diazotado, este conjugado é caracterizado pela formação da azobilirrubina vermelha, com a formação desta pode-se realizar a leitura em espectrofotômetro a 525nm.

Os resultados encontrados no presente estudo não mostram diferenças significativas nos níveis de bilirrubina direta, indireta e total nos grupos Controle, NFOH e NF, dentro de cada grupo. Também não foram verificadas diferenças

significativas quando comparados os grupos NFOH e NF com o grupo controle.

Esses resultados se encontram expostos nas tabelas 5, 6 e 7:

Tabela 5 – Bilirrubina Direta - Grupos Controle, NFOH e NF. Valores apresentados em média (IC95).

Bilirrubina Direta					
	Pré - Exposição	Dia 6	Dia 12	Dia 18	Pós - Exposição
Controle	0,168 _(0,042-0,293)	0,083 _(0,027-0,193)	0,320 _(0,138-0,501)	0,246 _(0,029-0,462)	0,102 _(0,039-0,164)
NFOH	0,309 _(-0,176-0,794)	0,216 _(-0,016-0,447)	0,273 _(0,152-0,393)	0,158 _(-0,105-0,326)	0,187 _(0,128-0,245)
NF	0,144 _(0,021-0,265)	0,180 _(-0,363-0,722)			

Tabela 6 – Bilirrubina Indireta – Grupos Controle, NFOH e NF. Valores apresentados em média (IC95).

Bilirrubina Indireta					
	Pré - Exposição	Dia 6	Dia 12	Dia 18	Pós - Exposição
Controle	0,624 _(0,349-0,898)	0,433 _(0,143-0,722)	0,520 _(0,049-0,990)	0,872 _(0,653-1,091)	0,720 _(0,325-1,115)
NFOH	0,977 _(0,284-1,660)	0,992 _(0,425-1,558)	0,733 _(-0,280-1,747)	0,805 _(0,389-1,220)	0,654 _(0,255-1,052)
NF	0,826 _(0,578-1,075)	0,647 _(-0,214-1,507)			

Tabela 7 – Bilirrubina Total – Grupos Controle, NFOH e NF. Valores apresentados em média (IC95).

Bilirrubina Total					
	Pré - Exposição	Dia 6	Dia 12	Dia 18	Pós - Exposição
Controle	0,792 _(0,120-1,126)	0,516 _(0,155-0,876)	0,762 _(0,107-1,417)	1,130 _(0,962-1,297)	0,822 _(0,438-1,206)
NFOH	1,243 _(0,839-1,647)	1,121 _(0,552-1,689)	1,006 _(0,038-1,973)	0,963 _(0,383-1,542)	0,841 _(0,424-1,257)
NF	0,970 _(0,645-1,295)	0,826 _(0,201-1,451)			

A não elevação dos níveis séricos de bilirrubina nos animais tratados com o NFOH sugere que esse não causa danos relacionados à obstrução do ducto biliar, prejuízos à conjugação hepática, bem como danos hepatocelulares. Com base nas tabelas apresentadas anteriormente, encontramos certa uniformidade de valores dentro de um mesmo tipo de bilirrubina. Os valores foram comparados entre si, porém não demonstraram alterações significativas.

3.2.4. GGT dos animais expostos

A GGT é uma enzima encontrada nas membranas celulares, no interior dos hepatócitos e células epiteliais biliares. Tem como substrato mais abundante a glutatona, sobre a qual seus papéis fisiológicos ainda são amplamente investigados. Embora tenha maior concentração no tecido renal, tem importância clínica relacionada a doenças do fígado e veias biliares – colestase e lesões hepáticas inflamatórias e tóxicas - sendo considerada um importante marcador de lesão hepatobiliar. Seu papel como marcador de lesão hepática é de alta sensibilidade, porém de pouca especificidade, uma vez que existem outras condições ou doenças, como pancreatite, diabetes, obesidade, uso excessivo de álcool e uso de drogas indutoras de enzimas, que podem fazer com que os níveis de GGT no soro sejam aumentados.

A utilização da GGT na verificação de lesão hepatobiliar é considerada uma ferramenta importante, mesmo com a baixa especificidade, uma vez que, na grande maioria dos pacientes com doença hepática sua concentração sérica é elevada, independentemente da causa do dano (Whitfield, 2001).

Conforme os dados expostos na tabela 8, os níveis séricos de GGT não apresentaram variações significativas para nenhum dos grupos de animais utilizados pelo estudo.

Tabela 8 – GGT – Grupos Controle, NFOH e NF. Valores apresentados em média (IC95)

	GGT				
	Pré - Exposição	Dia 6	Dia 12	Dia 18	Pós - Exposição
Controle	22,95 _(13,45-32,44)	24,48 _(11,12-37,83)	20,14 _(0,62-39,66)	24,52 _(12,47-36,56)	31,57 _(24,95-38,18)
NFOH	32,69 _(15,63-49,74)	20,91 _(14,0-27,39)	40,29 _(33,42-47,15)	46,92 _(18,37-75,46)	39,78 _(4,70-74,86)
NF	35,48 _(20,76-75,11)	24,65 _(-6,60-55,9)			

Apesar de não apresentarem diferenças significativas quando comparados, os níveis de GGT obtidos pelo estudo se encontram acima da faixa de normalidade esperada para coelhos, que é de aproximadamente 9,0 (Fierabracci *et al.*, 2012; Kaneko, Harvey & Bruss, 2008). Vale ressaltar, entretanto, que os valores encontrados no grupo controle (DMSO) já se encontravam acima do observado na literatura, de modo que não podemos atribuir, com certeza, essa alteração dos níveis normais da enzima GGT apenas ao NFOH e ao NF administrados.

O fato dos animais expostos não apresentarem diferenças significativas nos valores de GGT quando comparados com o grupo controle sugere que a alteração verificada com a administração apenas de DMSO não se agrava, nem regride, com a exposição ao NFOH nem ao NF. Dessa forma, podemos sugerir que os efeitos de ambos sobre os níveis séricos da GGT não sejam considerados exacerbados.

Podemos ainda atribuir os valores acima dos descritos em literatura a possíveis variações fisiológicas existentes nos animais dessa espécie. Isso porque

mesmo os valores de GGT referentes ao período de pré-exposição às substâncias já se encontravam acima dos citados, não apresentando variações significativas no decorrer da exposição.

3.2.5. CK-MB dos animais expostos

A introdução da análise deste biomarcador no presente trabalho se justifica como uma tentativa de verificar de maneira mais efetiva uma alteração bioquímica que pudesse ter levado os animais correspondentes ao grupo NF a morte. Sua inserção ocorreu já com o experimento em andamento, de modo que não foi possível a obtenção de amostras suficientes no grupo controle. Desta forma, as análises que seguem representam quantificações dos níveis séricos de CK-MB apenas nos grupos NFOH e NF, os quais foram comparados com os valores normais para coelhos descritos na literatura.

A CK, uma enzima rapidamente liberada quando há ocorrência de dano muscular, é caracterizada por catalisar a transferência de um grupo fosfato da creatina fosfato para adenosina trifosfato. Além de um marcador extremamente sensível de disfunções no músculo esquelético, a CK também é apontada como biomarcador de grande valor para avaliação de pacientes com infarto agudo do miocárdio. Sua especificidade no diagnóstico de infartos é relativamente maior que a verificada para marcadores como AST, uma vez que seus baixos níveis no fígado tornam os resultados menos confusos em pacientes com disfunções hepáticas (Aldous, 2012).

Ainda segundo Aldous, 2012, os avanços na quantificação da isoforma MB da creatina quinase permitiram a obtenção de resultados mais específicos para músculo cardíaco, principalmente pelo fato desse tipo de musculatura possuir níveis

mais elevados de CK-MB (25- 30%) quando comparada à esquelética (1%). Desta forma, a quantificação da CK-MB se faz uma ferramenta mais específica para diagnóstico de infarto agudo do miocárdio.

Os níveis séricos de CK-MB obtidos pelo presente estudo, bem como o valor de referência para coelhos, obtido por Borboleta *et al.* (2011), são apresentados pela figura 7 adiante:

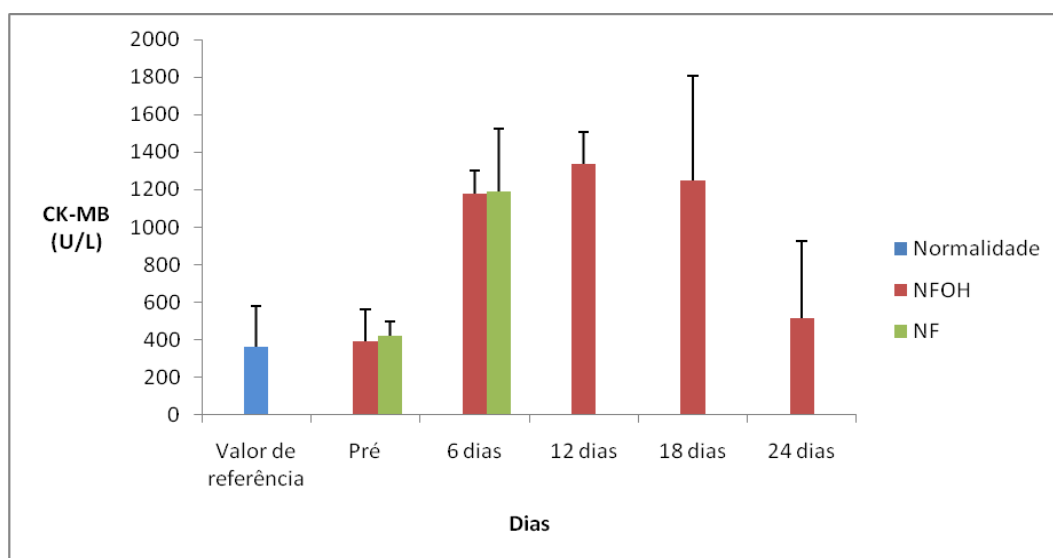


Figura 7 – Comparação dos níveis de CK- MB entre grupos NFOH, NF e valor de referência.

Notamos que, no período que antecedeu a exposição, os animais dos grupos NFOH e NF possuíam níveis séricos da isoforma MB da creatina quinase condizentes com a normalidade, não sendo verificada nenhuma grande alteração previa a administração.

É possível observar ainda que os valores encontrados para a CK-MB pós-exposição dos animais de ambos os grupos se apresentam consideravelmente acima daquele esperado na literatura – a elevação ocorre já nos seis primeiros dias de exposição. Tal resultado sugere que tanto o NFOH quanto o NF possam estar contribuindo para comprometimento cardíaco dos animais. Esse comprometimento,

contudo, pode não ser grande o suficiente para elevar a concentração sérica de AST, uma vez que este marcador também deveria alterar-se com lesões no miocárdio.

Ainda, vale ressaltar que a não existência de um grupo controle na análise da CK-MB faz com que se torne difícil a confirmação de que tal variação seja exclusivamente devida ao emprego dos fármacos, visto que o DMSO poderia também ser o causador.

No que se diz respeito à elevada mortalidade dos animais do grupo NF, não podemos ainda concluir que os animais tenham realmente morrido em decorrência de infarto agudo do miocárdio, uma vez que os valores de CK-MB do grupo NFOH também se apresentaram consideravelmente elevados e nenhum animal do grupo veio a óbito.

No entanto, o dano cardíaco é uma hipótese viável para o desfecho de letalidade observada no grupo NF, que deve ser confirmada em estudos posteriores.

4. CONCLUSÃO

Tomando como base os resultados obtidos, podemos concluir que o NFOH não produz elevações significativas nos níveis de AST e ALT dos animais a ponto de nos levar a considerar risco de dano hepático. A bilirrubina de ambos os grupos não apresentou variações significativas.

A GGT, porém, encontrou-se elevada não só nos grupos NFOH e NF, mas também nos animais do grupo controle, expostos a DMSO. Desse modo, não é possível afirmar se a elevação foi decorrente da administração de NFOH e/ou NF ou causada pelo veículo utilizado.

Assim, concluímos que o NFOH não demonstrou potencial hepatotóxico nos animais submetidos ao tratamento, quando analisamos os biomarcadores citados.

A análise da CK-MB dos grupos NFOH e NF revelou que ambos foram capazes de elevar os níveis séricos dessa enzima, levantando a suspeita de potencial dano cardíaco. A inexistência de um grupo controle nessa análise impossibilita concluir se essa elevação foi decorrente da administração de DMSO. Esses efeitos, contudo, parecem não ter sido a causa da alta mortalidade entre os animais do grupo NF.

Os resultados encontrados pelo presente estudo sugerem que seria interessante o prosseguimento dos estudos acerca das propriedades cardiotóxicas do NFOH. Ainda, é interessante o desenvolvimento de formulações para incorporá-lo e evitar o uso de solventes como o DMSO, tendo em vista que a baixa solubilidade do fármaco em água é um obstáculo à sua administração.

5. REFERÊNCIAS

ALDOUS, S. J. Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction. **Int J Cardiol**, 2012.

ALVES, G. E. S. Dimetil sulfóxido (DMSO). **Saúde Equina**, n.6, p.6-10, 1998.

AMATO NETO, V.; PASTERNAK, J. Centenário da doença de Chagas. **Rev de S Púb**, v.43, n. 2, p. 381-382, 2009.

ANDRADE, A.L. et al. Randomized trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet**, v.348, p.1407-1413, 1996.

ANANDAN, J. V. Parasitic disease. **Pharmac.** a pathophysiologic approach. 3rd ed. London: Appleton & Lange, 1997.p.2161-2172

BARBOSA, C. F. et al. Rapid test for the evaluation of the activity of the prodrug hydroxymethyl nitrofurazone in the processing of *Trypanosoma cruzi* messenger RNAs. **Braz J Med Biol Res.**, v. 40, n.1, p.33-39, 2007.

BORBOLETA, L. R. et al. Biochemistry profile after experimental intoxication by extract of *Mascagnia rigida* (A. Juss.) Griseb. (Malpighiaceae) in rabbits. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.5, p. 1113 -1123, 2011.

BOSQUESI, P. L. et al. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 29, n.3, p. 231-238, 2008.

BURTIS C. A., ASHWOOD E. R., BRUNS, D. E. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 4^o ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006.

CHUNG, M. C. et al. Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofurural e primaquina potencialmente antichagásicos. São Paulo. 1996. 196 f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

CHUNG, M. C. et al. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic Hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new Nitrofurazone Prodrug. **Bioorg & Med Chem**, n.11, p.4779–4783, 2003.

COURA, J.R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy – a proposal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, n. 4, p.549-554, 2009.

COURA, J. R., BORGES-PEREIRA, J. Chagas Disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Rev da Soc Bras de Med Trop**, v.45, n.3, p.286-296, 2012.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, n.1, p. 3-24, 2002.

COURA, J.R., DIAS, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, p.31-40, 2010.

DIAS, L. C. et al. Chemotherapy of chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. **Quím. Nova**, v.32, n.9, p.2444-2457, 2009.

FERREIRA, H. de O. Forma aguda da doença de chagas tratada pela nitrofurazona. **Rev Inst Med Trop**, n. 3, p.287-289, 1961.

FIERABRACCI, V., et al. Developmental variations of plasma gamma-glutamyltransferase fractions in humans and in laboratory mammals. **Biomarkers**, v.17, n.1, p.43–47, 2012.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. **Curso de manipulação de animais de laboratório**. Salvador, Bahia, 2005.

FDA GUIDANCE DOCUMENT: guidance for Industry: M3 Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals. Washington: FDA, 1997.

FUENTES, R. B. et al. Eficacia de nifurtimox para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas crônica. **Rev Chil Infect**, v.29, n.1, p.82-86, 2012.

GOVERNO DO ESTADO DE PERNAMBUCO. Notícias da Secretaria Estadual da Saúde, Jornal do Commercio, 18 de agosto, 2013.

GÜIDO, R. V. C., et al. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofural (nitrofurazona). **Rev Ciênc Farm**, v.22, n.2, p. 319 – 333, 2001.

HASHIMOTO, K.; YOSHIOKA, K. Review: surveillance of Chagas Disease. **Adv in Parasitol**, v. 79, p. 375-428, 2012.

JACOB, S. W., WOOD, D. C. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) toxicology, pharmacology, and clinical experience. **Americ Journ of Surg**, v.114, n.3, p.414-426, 1967.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6^o ed. Elsevier Inc. 2008.

LEE, B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **Lancet Infect Dis**, v.13, n.4, p.342–48, 2013.

LUNA, K.P. et al. In *vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexa decyl phosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. **Biom**, v.29, n.3, p.448-455, 2009.

MELO, M. F. F. Preparação e determinação da atividade toxicológica do pró-fármaco hidroximetilnitrofural, potencialmente antichagásico. Tese (Mestrado em

Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos). 2006. 91f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

OTERO, L. et al. Novel antitrypanosomal agents based on the Palladium Nitrofutylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. **J Med Chem**, v.49, n.11, p.3322-3331, 2006.

PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurantoin compounds. **J Parasitol**. v.38, p.30-40, 1952.

PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurantoin compounds. **Antibiotics & Chemotherapy**. v.7, p.13-23, 1957.

PEREIRA NUNES, M.C. et al. Chagas Disease: an Overview of Clinical and Epidemiological Aspects, **Journ of the Amer Coll of Cardio**, v.62, n.9, p.767-776. 2013.

PINAZO M. J. et al. Immunosuppression and Chagas Disease: a management Challenge. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.7, n.1, e.1965, 2013.

RAETHER, W., HANEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitol Rese**, v.90, n.1, p S19-S39, S.1, 2003.

RAND-LUBY, L. et al. Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. **Ann. Surg**, v.224, n.4, p.583-590, 1996.

SALOMON, C. J. First Century of Chagas' Disease: An Overview on Novel Approaches to Nifurtimox and Benznidazole Delivery Systems. **Jour of Pharma Sci**, v.101, n.3, 2012.

SERAFIM, E. O. P. Conversão in vitro e ex vivo do pró-fármaco hidroximetilnitrofurais, candidato a fármaco antichagásico. Tese (Doutorado em Química) 2008. 133f., Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2008.

TRACY, J.W.; WEBSTER J.R., Chemotherapy of parasitic infections. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., GILMAN, A. G. (Ed.) **Goodman & Gilman's the pharmacological basics of therapeutics**. 10. ed. New York: McGraw Hill, p.1059-1069, 2001.

URBINA, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v.115, v.1-2, p.55–68, 2010.

WHITFIELD, J. B. Gamma glutamyl transferase, **Critic Rev in Clin Lab Sci**, v.38, n.4, p.263–355, 2001.

WILKINSON, S. R., KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: Mechanisms, resistance and new targets. **Expert Rev Mol Med**, v.11, e.31, Oct 29, 2009.

WILSON, J.E., BROWN, D. E., TIMMERS, E. K. A toxicology study of dimethyl sulfoxide. **Toxic. and Appl. Pharmac.**, v.7, n.1, p.104- 112, 1965.

WHO. World Health Organization. Weekly epidemiological record. v.51/52, n.87, p.509–526, 2012.

YU, C. Y. The Valuation of blood and tissue enzymes for clinical diagnosis in New Zealand White and Rex Rabbits. **Taiwan Vet J**, v. 35,n.1, p.1-8, 2009.

6. ANEXO



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



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 10/2011

Pesquisador: DIEGO VINÍCIUS DE PONTES MACHADO

Orientador: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Hepatotoxicidade do Hidroximetilnitrofuril – potencial pró-fármaco antichagásico

Parecer nº 15/2011 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Hepatotoxicidade do Hidroximetilnitrofuril – potencial pró-fármaco antichagásico", apresentado pelo acadêmico Diego Vinícius de Pontes Machado, sob orientação da Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, 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 agosto de 2012, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 08 de agosto de 2011.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Diego Vinícius de Pontes Machado

De Acordo,

Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini
(Orientadora)

Araraquara, 21 de outubro de 2013.