

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Jussara Simmer Bravin

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DE UM ANÁLOGO DE  
MEXILETINA CANDIDATO A FÁRMACO ANTIASMÁTICO.**

Rio de Janeiro

2016

Jussara Simmer Bravin

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA ORAL DE UM ANÁLOGO DE  
MEXILETINA CANDIDATO A FÁRMACO ANTIASMÁTICO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientador: Dr. Fabio Coelho Amendoeira  
Coorientadora: Dra. Helena Pereira Zamith

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Bravin, Simmer Jussara

Avaliação da toxicidade oral aguda de um análogo de mexiletina candidato a fármaco antiasmático / Jussara Simmer Bravin. – Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2016.

109 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

Orientador: Fábio Coelho Amendoeira

1. Asma. 2. Química Farmacêutica. 3. Toxicidade Aguda. 4. Experimentação Animal. 5. Vigilância Sanitária. I. Título

Evaluation of acute oral toxicity a mexiletine analog of candidate to drug  
antiasthmatic.

**Jussara Simmer Bravin**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA ORAL DE UM ANÁLOGO DE  
MEXILETINA CANDIDATO À FÁRMACO ANTIASMÁTICO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Fausto Klabund Ferraris (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

---

Marcel Frajblat (Doutor)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

---

Jorge Carlos Santos da Costa (Doutor)  
Instituto Oswaldo Cruz

---

Fabio Coelho Amendoeira (Doutor) – Orientador – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Lauro Bravin e Elisabeth Simmer (*in memoriam*), por me darem o dom da vida e serem meus exemplos, e Neuza Araújo de Castro, por ser minha madrastra de titulação, mas mãe em sua essência. Vocês são minhas raízes.

As minhas filhas, Letícia, Lara e Luísa. Meu TUDO. Sem vocês a vida não teria a mesma cor, cheiro e sabor. Minhas sementes.

Ao meu marido Miguel Ângelo. Por dividir a vida, o trabalho nesta Instituição, a paixão por animais e o peso da responsabilidade de sermos o que somos. Pelas inúmeras idéias e ajudas. Sem seu ombro amigo e seu braço forte eu não teria conseguido. És o tronco que me sustenta.

As minhas irmãs Simone e Bernadeth. Colos que permitem que meu coração tenha sossego. Meus ramos.

Aos meus orientadores Fábio e Helena. Por terem me aceito, por me conduzirem no mundo acadêmico e, sobretudo por vossas infinitas paciências para com minhas limitações. Vento e chuva que modificam a paisagem e a fertilizam.

Aos meus queridos amigos do Serviço de Animais de Laboratório: Reginaldo, Marcos, Terezinha, Dorca, Izabel, Júlio, Joana, Ana Teresa, Cleuza, João, Thaiz, Júlio Silvestre, Joelma, Rosimeire e Marcia. Por me incentivarem e por sempre acreditarem em mim. Todas as flores do meu jardim.

Aos amigos do DFT: Fausto, Tiago, Renata e Magno, bem como os alunos de pós-graduação do LabFar: Esdras, Flávia, Lívia, Amanda, Thaís, Sibebe, Wil, Letícia, Nat. Pelas inúmeras ajudas, de várias formas possíveis! Não consigo enumerar o quanto aprendi com todos vocês. O vai e vem das abelhas operárias.

Aos Doutores Jorge Costa e Marco Aurélio Martins, por dividirem com o INCQS a jornada da JME-173 e permitirem esta contribuição. Os jequitibás.

A Fundação Oswaldo Cruz, por me proporcionar oportunidade em contribuir de alguma forma com a história desta Instituição e da Ciência Brasileira. A alameda de frondosas árvores onde me instalei.

Aos animais de laboratório, por contribuírem de forma ÍMPAR para o avanço da Ciência.

Enfim, à Deus... Por me permitir vivenciar tudo isso!

## PRECE DA SERENIDADE

*Concedei-me a serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar aquelas que posso e sabedoria para distinguir uma da outra.*

*(Autoria desconhecida, utilizada nas reuniões de A.A. presididas por Elisabeth Simmer – in memoriam)*

## RESUMO

A asma é uma doença crônica de repercussão mundial, e definida como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, na qual muitas células e elementos celulares têm participação. É uma síndrome respiratória complexa, com diferentes fenótipos clínicos em adultos e em crianças, cujos principais sintomas são os episódios de sibilos, dispnéia, aperto no peito ou desconforto torácico e tosse, decorrentes da hiper-responsividade das vias aéreas, com produção intensa de muco e conseqüente broncoespasmo com obstrução reversível ao fluxo aéreo. Casos cujo remodelamento brônquico seja refratário aos medicamentos é o maior desafio clínico, pois risco real de agudização que pode levar o paciente ao óbito. O presente trabalho avaliou a toxicidade oral aguda de uma nova molécula, análoga a mexiletina, desenvolvida pela equipe de pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz e Farmanguinhos da Fiocruz, codificada como JME-173, com potenciais de ação miorrelaxante brônquica. Utilizou o Guia de Condução de Ensaios Não Clínicos da ANVISA e o Guia da OECD nº 420. Para este estudo foram utilizados ratos Wistar e coelhos Nova Zelândia albino, de ambos os sexos, nas doses de 5 mg/kg; 50 mg/kg; 300 mg/kg e 2000 mg/kg; com n=5 por grupo. Avaliou-se: ganho de peso final, ingestão de alimento, sinais clínicos pré-estabelecidos, hematologia e bioquímica séricas e exame anatomopatológico. Não ocorreu óbito e não houve surgimento de sinais clínicos relacionados à toxicidade. Observou-se nos seguintes parâmetros alterações estatisticamente significativas em relação ao grupo controle e fora da faixa de variação laboratorial: aumento do hematócrito em coelhos machos, aumento dos leucócitos em coelhos fêmeas, aumento do sódio em ratos machos, aumento da uréia em coelhos fêmeas, diminuição da proteína sérica em coelhos machos. Demais parâmetros se encontravam dentro da faixa de variação da referência laboratorial. Houve aumento do tamanho do coração e diminuição tamanho do timo que não implicaram em alterações clínicas. Os resultados encontrados sugerem que a molécula JME-173 poderá ser classificada de acordo com a orientação GHS como categoria 5, pela ausência de óbitos e de sinais clínicos de toxicidade oral aguda, sendo forte candidata à continuidade dos estudos pré-clínicos, visando cumprimento regulatório da ANVISA necessários seu desenvolvimento e futura comercialização.

Palavras chave: Asma. Desenvolvimento de Fármaco. JME-173. Toxicidade Aguda. Experimentação Animal. Vigilância Sanitária.

## ABSTRACT

Asthma is a chronic disease of worldwide repercussions defined as a chronic inflammatory disease of the airways with participation of many cells and cellular elements. It is a complex respiratory syndrome with different clinical phenotypes in adults and children, its main symptoms are episodes of wheezing, breathlessness, chest tightness or chest discomfort and coughing, resulting from hyper responsiveness of the airways, with intense production of mucus and consequent bronchospasm with reversible airflow obstruction. The biggest clinical challenge is related to cases of bronchial remodeling refractory to drugs as real risk of exacerbation that may lead to death. This study evaluated the acute oral toxicity of a new molecule, similar to mexiletine, developed by the research team of IOC and Farmanguinhos Fiocruz called JME-173 with potential bronchial relaxant action. The ANVISA non clinical tests guide and the OECD Guide no. 420 were used. Wistar rats and New Zealand albino rabbits of either sex were used at doses of 5 mg / kg; 50 mg / kg; 300 mg / kg and 2000 mg / kg; with n = 5 per group. Weight gain, feed intake, pre-established clinical signs, hematologic evaluation and serum biochemistry and pathology were evaluated. There were no deaths, and there were no clinical signs of onset related to toxicity. The following parameter changes observed were statistically significant compared to the control group and outside the laboratory variation range: increased hematocrit in male rabbits, increased white blood cells in female rabbits, increased sodium in rats, increased urea in female rabbits, decreased serum protein in male rabbits. Other parameters are within the variation range of the laboratorial reference. Increase in heart size and decreased size of the thymus were observed. There was increase in heart size and decreased size of the thymus that did not result in clinical. Results indicate that the JME-173 molecule showed no acute oral toxicity, suggesting to classify it according to GHS as category 5, being a strong candidate for the continuation of pre-clinical studies aiming to meet ANVISA's regulatory compliance; necessary for the development of its future marketing.

Keywords: Asthma. Drug Development. JME-173. Acute Toxicity. Animal Experimentation. Health surveillance



## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Internações por asma, em indivíduos maiores de 20 anos, entre janeiro de 2000 e dezembro de 2011 .....	23
Figura 02 – Fisiopatogenia da asma .....	26
Figura 03 – Recomendações da SBPT para o tratamento inicial da asma, baseado na gravidade .....	32
Figura 04 – Fases do desenvolvimento de novos fármacos .....	42
Figura 05 – Fórmulas estruturais da molécula “JME 173” e dos seus congêneres lidocaína e mexiletina .....	46
Figura 06 – Sondas para gavagem .....	50
Figura 07 – Condução do Teste de Toxicidade Aguda da molécula JME – 173 .....	51
Figura 08 – Punção cardíaca em ratos Wistar .....	55

## LISTA DE QUADROS

Quadro 01 – Classificação das substâncias de acordo com o GHS, uso oral.....	43
Quadro 02 – Informações do rótulo da ração peletizada da marca comercial Nuvilab®, formulação para Animais de Laboratório: Camundongo/Ratos e Coelhos.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Avaliação dos Sinais Clínicos, em Ratos Wistar, 14 dias após a administração oral em dose única de JME-173.....	59
Tabela 02 – Avaliação dos Sinais Clínicos, em Coelhos Nova Zelândia albino, 14 dias após a administração oral em dose única de JME-173.....	60
Tabela 03 – Avaliação do Ganho de Peso Final (g) em Ratos Wistar, 14 dias após a administração oral em dose única de JME-173.....	61
Tabela 04 – Avaliação do Ganho de Peso Final (g) em Coelhos Nova Zelândia albino, 14 dias após a administração oral em dose única de JME-173.....	62
Tabela 05 – Avaliação da Média da Ingestão Alimentar (g) por indivíduo, em Ratos Wistar, 14 dias após a administração oral em dose única de JME-173.....	63
Tabela 06 – Avaliação da Média da Ingestão Alimentar (g) por indivíduo, em Coelhos Nova Zelândia albino, 14 dias após administração oral em dose única de JME-173.....	64
Tabela 07 – Avaliação hematológica de Ratos Wistar, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.....	65
Tabela 08 – Avaliação hematológica de Coelhos Nova Zelândia albino, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.....	69
Tabela 09 – Bioquímica sérica de Ratos Wistar machos, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.....	72
Tabela 10 – Bioquímica sérica de Ratos Wistar fêmeas, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.....	73
Tabela 11 – Bioquímica sérica de Coelhos Nova Zelândia albino machos, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.....	78
Tabela 12 – Bioquímica sérica de Coelhos Nova Zelândia albino fêmeas, 14 dias após a administração oral em dose única de JME-173.....	79
Tabela 13 – Resultados Anatomopatológicos do exame macroscópico em Ratos Wistar, 14 dias após a administração oral em dose única de JME-173.....	80
Tabela 14 – Resultados Anatomopatológicos do exame macroscópico em Coelhos Nova Zelândia albino, 14 dias após a administração oral em dose única de JME-173.....	80
Tabela 15 – Peso absoluto e relativo dos órgãos de Ratos Wistar machos, 14 dias após a administração oral em dose única de JME-173.....	82

Tabela 16 – Peso absoluto e relativo dos órgãos de Ratos Wistar fêmeas, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.....	83
Tabela 17 – Peso absoluto e relativo dos órgãos de Coelhos Nova Zelândia albino machos, 14 dias após a administração oral em dose única de JME-173.....	84
Tabela 18 – Peso absoluto e relativo dos órgãos de Coelhos Nova Zelândia albino fêmeas, 14 dias após a administração oral em dose única de JME-173.....	85

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01: Média de Peso (g) nos dias 0, 1, 3, 7 e 14, após a administração oral em dose única de JME-173, em Ratos Wistar. Machos (A) e Fêmeas (B).....	61
Gráfico 02: Média de Peso (g) nos dias 0, 1, 3, 7 e 14, após a administração oral em dose única de JME-173, em Coelhos Nova Zelândia albino. Machos (A) e Fêmeas (B).....	62

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 01 – Classificação da gravidade da asma, de acordo com a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.....	106
Anexo 02 – Fluxograma do guia da OECD N° 420 para teste de toxicidade aguda.....	107
Anexo 03 – Certificado Licença CEUA – FIOCRUZ.....	108
Anexo 04 – Tabela elaborada para a avaliação dos sinais clínicos.....	109

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas  
ABQI – Associação Brasileira de Química Industrial  
AC – Antes de Cristo  
ALT – Aspartato Aminotransferase  
APC – Célula Apresentadora de Antígeno  
AST – Alanino Aminotransferase  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ANTI-Ig E – Anti-imunoglobulina E  
BACA – Agonistas Beta Adrenérgico de Curta Duração  
CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório  
CEUA – Comitê Ético no Uso de Animais de Laboratório  
CID – Código Internacional de Doenças  
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
COX-Ciclooxigenase  
DATASUS – Departamento de Informações do SUS  
DBCA – Diretrizes Básicas no Cuidado para Animais de Experimentação  
DE – Dose estimada  
DL – Dose letal  
EPO – Eosinophilperoxidase  
FA – Fosfatase Alcalina  
FAR – Farmanguinhos  
FDA – Food and Drug Administration  
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz  
FISPQ – Ficha de Informação de Segurança para Produtos Químicos  
G – Grama  
GHS – Globally Harmonized Systemic  
GINA – Global Initiative for Asthma  
GR – Receptor de Glicocorticóide  
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média  
HCMC – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média  
HCT – Hematócrito  
HGB - Hemoglobina

HHA – Hipófise-Hipotálamo-Adrenal  
HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida  
HPA – Human Leukocyte antigen  
ICH – Internation Council on Harmonisation  
IFN – Interferon gama  
IG – E – Imunoglobulina E  
IL – Interleucina  
IM – Intramuscular  
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual  
IOC – Instituto Oswaldo Cruz  
IP – Intraperitoneal  
IV – Intravenoso  
K – Potássio  
KG – Kilograma  
LACA – Agonistas Beta Adrenérgico de Longa Duração  
LEUCO - Leucócitos  
LTD4 – Leucotrieno D4  
MBP – Major Basic Protein  
MG – Miligrama  
MHC-II – Major Histocompatibility Complex II  
MI – Mililitro  
Na – Sódio  
OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development  
P – Fósforo  
PAF – Fator de Agregação Plaquetária  
PC – Peso Corporal  
PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde  
PGD-2 – Prostaglandina D2  
PLAQ - Plaquetas  
PO – *Per Os*  
POP – Procedimento Operacional Padronizado  
PTN – Proteína  
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada



SAL – Serviço de Animais de Laboratório  
SBPT – Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia  
SIH – Sistema de Informação Hospitalar  
SUS – Sistema Único de Saúde  
TGF – Transforming Growth Factor  
TNF – Tumor Necrosis Factor  
T-REG – Células T regulatórias  
VEGF – Factor Growth Endotelial Vascular  
VSR – Vírus sincicial respiratório  
WHO – World Health Organization  
XX – Vinte

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	22
1.2 MECANISMOS E FISIOPATOGENIA DA ASMA .....	24
1.3 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PRECONIZADAS PELO SUS .....	30
1.3.1 Glicocorticóides .....	32
1.3.2 Agonistas dos receptores adrenérgicos .....	34
1.3.3 Anticolinérgicos .....	35
1.3.4 Metilxantinas .....	35
1.3.5 Cromonas .....	36
1.3.6 Antagonistas dos receptores de leucotrienos .....	36
1.3.7 Anticorpo Monoclonal Anti- Ig E .....	37
1.4 NOVAS PROPOSTAS TERAPÊUTICAS .....	37
1.4.1 Termoplastia .....	38
1.4.2 Anestésicos locais .....	39
1.4.3 Análogo do antiarrítmico mexiletina: a molécula JME-173 .....	40
1.5 REGULAMENTAÇÃO DE NOVOS MEDICAMENTOS .....	41
<b>2 OBJETIVO</b> .....	45
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	45
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	46
3.1 SUBSTÂNCIA TESTE: JME-173 .....	46
3.2 OS ANIMAIS UTILIZADOS .....	47
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL .....	49
3.4 PARÂMETROS AVALIADOS .....	50
3.4.1 Avaliação do ganho de peso final e da ingestão alimentar .....	51
3.4.2 Avaliação dos sinais clínicos .....	52
3.4.3 Determinação de <i>Endpoint</i> . .....	53
3.4.4 Avaliação hematológica e bioquímica séricas .....	54
3.4.5 Finalização humanitária .....	56
3.4.6 Avaliação anatomopatológica e avaliação do peso dos órgãos .....	56
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	57
<b>4 RESULTADOS</b> .....	59
4.1 AVALIAÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS .....	59

4.2 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO FINAL .....	60
4.3 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR .....	63
4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS .....	64
4.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS .....	76
4.6 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA .....	80
4.7 AVALIAÇÃO DO PESO DOS ÓRGÃOS .....	81
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>106</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A primeira descrição da asma na nomenclatura médica ocidental foi relatada no "*Corpus Hippocraticum*" de Hipócrates (460-375 AC), referindo-se ao estado ofegante no qual o paciente se apresentava, porém há relatos da doença no livro "Nei Ching" (conhecido como o Livro do Imperador Amarelo) que data de 2.600 AC, descrito sob a forma de diálogo entre o imperador e seu médico, *Chi'i Po*, no qual é citada a planta *Ma Huang*, de onde a efedrina passou a ser extraída no início do século XX (COHEN, 1992 e OLSEN, 2011).

Na Idade Moderna, Paracelsus (1493-1541) conhecido como o "pai da farmacologia e terapêutica", foi o responsável pela introdução do conceito de doença na medicina e trabalhou em prol da cura das doenças através de meio de substâncias químicas purificadas e não somente por ervas e infusões (OLSEN, 2011). A partir da invenção de métodos de auxílio ao diagnóstico como o estetoscópio em 1819 e o raios-X em 1895, a doença passa a ser melhor esclarecida, havendo uma melhora na forma de se realizar o controle dos sintomas (COHEN,1992).

Entre 1930 e 1950, o caráter psicológico foi atribuído aos sintomas da doença, o que impediu maiores avanços científicos nesta época. Considerava-se que se a sua causa fosse psicológica, o tratamento muitas vezes baseava-se na psicanálise ou outras terapias conversacionais (COHEN, 1992; RODRIGUES, 2007).

A asma só foi plenamente reconhecida como doença inflamatória por volta do início da década de 60, com o advento do uso dos corticosteroides, e com o aumento dos conhecimentos sobre a bioquímica corpórea e a elucidação sobre as funções das citocinas, do interferon e da adenosina monofosfato cíclico – AMP-c, bem como o isolamento das prostaglandinas e as primeiras descobertas sobre o envolvimento dos linfócitos como as principais células imunocompetentes. Também nesta década, inicia o uso dos broncodilatadores adrenérgicos, de ação rápida e efeitos que persistiam por até 4 horas (RODRIGUES, 2007).

Nos anos 90 a asma foi considerada uma doença inflamatória. Passa-se também a utilizar os primeiros broncodilatadores de longa duração como o salmeterol. Nos anos 2000 é identificado um grupo de linhagens distintas de linfócitos T que atuam como reguladoras da asma, e neste mesmo período foi

descoberto o primeiro gene relacionado à asma. Em 2003, o anticorpo monoclonal anti-imunoglobina – E, omalizumabe, é aprovado para tratamento da asma alérgica e persistente (RODRIGUES, 2007) e inicia-se o desenvolvimento de novas terapias contra a asma a partir da compreensão da sinalização entre as diversas células (CHOBY e LEE, 2015).

A asma é uma patologia crônica de repercussão mundial. Segundo o Código Internacional de Doenças / CID-10 é classificada como J-45, e de acordo com IV Diretrizes para o Manejo da Asma (2012) da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia – SBPT em consonância com a *Global Initiative for Asthma* – GINA (2014) a asma é definida como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, na qual muitas células e elementos celulares têm participação.

Conforme as definições da GINA e da SBPT, bem como diversos autores (CAMPOS, 2007; CHOBY e LEE, 2015; MAUAD et al, 2009; SANTOS et al, 2007; SILVA e DIAS, 2013), a asma é uma síndrome respiratória complexa, com diferentes fenótipos clínicos em adultos e em crianças, e deve ser avaliada criteriosamente para a sua correta classificação e escolha do melhor tratamento para o paciente.

Os sintomas mais comuns são os episódios de sibilos, dispneia, aperto no peito ou desconforto torácico e tosse (CAMPOS, 2007; GINA, 2014; SBPT, 2012), decorrentes da hiper-responsividade das vias aéreas, com produção intensa de muco e conseqüente broncoespasmo com obstrução reversível ao fluxo aéreo.

O diagnóstico é eminentemente clínico, levando-se em consideração as comorbidades como obesidade, alergia e doença cardíaca associada, além de outros fatores como poluição, gestação e sensibilizadores ocupacionais, por exemplo. Além disso, utiliza-se conjuntamente, questionários específicos como os da GINA e da SBPT, e medidas da função pulmonar, que visam quantificar a intensidade da obstrução brônquica através da análise dos volumes e fluxos broncopulmonares provenientes dos resultados de testes espirométricos; pode-se então obter a classificação da gravidade da doença conforme a orientação da SBPT no anexo 01; e auxiliar a percepção do próprio paciente, bem como optar pela melhor conduta no tratamento (GINA, 2014 e LEITE et al, 2008).

O não controle dos sintomas clínicos aumenta as visitas aos atendimentos de emergência, com possíveis internações, impondo grande impacto social e econômico ao paciente, contribuindo para a piora da qualidade de vida (SANTOS et al, 2007; COSTA, 2005).

De acordo com Santos e colaboradores (2007), os custos diretos com a doença são baseados em gastos com medicamentos e/ou equipamentos, consultas médicas e hospitalizações. Os custos indiretos envolvem absenteísmo escolar e laboral do próprio paciente ou de seu acompanhante quando for o caso, diminuindo a produtividade no trabalho e gerando potenciais despesas com a Previdência Social (COSTA, 2005).

Nos pacientes com sintomas clínicos não controlados, há alterações anátomo-funcionais das vias aéreas, em maior ou menor grau, denominado remodelamento brônquico, e que está diretamente relacionado ao prognóstico da doença (GINA, 2014). Este paciente, geralmente refratário aos medicamentos comumente disponíveis, representa o maior desafio clínico, pois há o real risco de agudização do quadro, que poderá leva-lo ao óbito (CAMPOS, 2007; RODRIGUES, 2007).

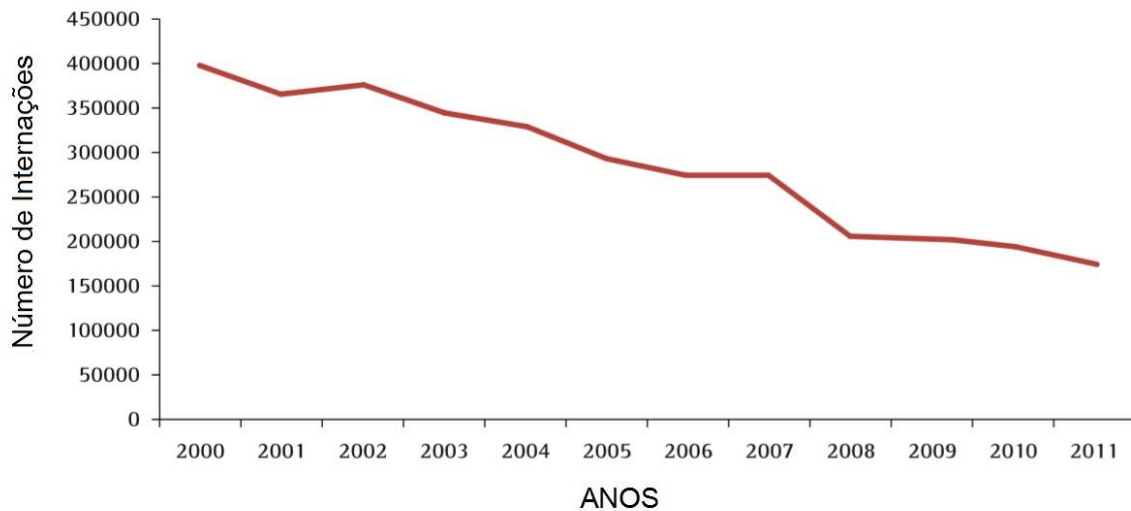
Estima-se que 300 milhões de pessoas sofram de asma em todo o mundo (GINA, 2014) representando um problema global, de elevada morbidade, sendo assim grande importância econômica o seu controle (COSTA, 2005).

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA

De acordo com o Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde – DATASUS, as taxas de hospitalização por asma em indivíduos maiores de 20 anos diminuíram em 49% entre 2000 e 2010 conforme a figura 01.

No ano de 2011 foram registradas em torno de 160 mil hospitalizações, tendo a asma como a causa primária da internação, em todas as faixas etárias, colocando-a como a quarta causa de internações no referido ano, e totalizando 2,3% de todas as internações. A média de mortalidade no Brasil entre 1998 e 2007, foi de 1,52/100.000 habitantes, variando entre 0,8 a 1,72/100.000 habitantes.

Figura 01: Internações por asma em indivíduos maiores de 20 anos entre janeiro de 2000 e dezembro de 2011.



Fonte: Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, IV Diretrizes para o Manejo da Asma (2012).

Mauad e colaboradores (2000) observaram em seus estudos que a tendência declinante dos números de óbito pode também estar demonstrando apenas as falhas no sistema de notificação de óbitos, pois são oriundos em sua grande maioria de registros administrativos hospitalares do Sistema Único de Saúde – SUS, com pouca adesão dos números da rede particular, o que pode modificar a percepção dessa situação, além da própria alteração nas nomenclaturas das doenças nas atualizações da CID nos últimos anos que pode ser o causador desse viés no momento de inserir os dados no DATASUS (NETO, 2007).

Em suas observações, Gazzotti e colaboradores (2013) constataram que em média somente 10% da população asmática brasileira têm a asma controlada segundo os critérios da GINA e apenas 6,5% são corretamente diagnosticados e tratados. Nesse estudo, constatou-se que os grupos com asma não controlada e parcialmente controlada apresentaram maior número de visitas às emergências, num total de 57,5% e 62% respectivamente; do que o grupo que possuía a asma controlada (35,1%).

Segundo Santos em consulta ao DATASUS no ano de 2007, ocorreram cerca de 273.000 internações por asma no SUS, gerando um custo médio de US\$

200/paciente. Assim, os custos diretos de pacientes não controlados podem chegar a até oito vezes mais ao sistema de saúde pública do governo federal do que os pacientes controlados, conforme seu estudo.

De acordo com Damasceno e colaboradores (2012), analisando os dados do Sistema de Informações Hospitalares - SIH no período de 1992-2006, a asma foi responsável por 322.053 hospitalizações por ano, totalizando uma média de 822 internações por dia, com custo de US\$ 52 milhões de dólares ao ano, e em alguns anos estes custos ultrapassam o valor gasto para tratamento de doenças como HIV e tuberculose (COSTA, 2005; NETO, 2007).

## 1.2 MECANISMOS E FISIOPATOGENIA DA ASMA

Nos últimos anos foram observados grandes avanços na compreensão da fisiopatogenia da asma. Estabeleceu-se a compreensão de que a patogenia básica da asma é eminentemente inflamatória (CAMPANHA, 2008). Este processo inflamatório é complexo e interativo, envolvendo múltiplas células e mediadores. Todas as células do sistema respiratório, até mesmo as constitutivas que tradicionalmente são consideradas como não tendo potencial inflamatório, como por exemplo as células epiteliais; participam das alterações típicas da asma e contribuem para a diversidade clínica da doença (CAMPOS, 2007; COSTA, 2005; MARTINEZ e VENCELLI, 2007; RODRIGUES, 2007).

Acredita-se que os sintomas da doença dependam tanto da exposição aos fatores ambientais como a predisposição genética do indivíduo (CAMPOS, 2007 e SBPT, 2012). Genes funcionais tais como: ADAM33, HLA-G, GATA-3 e STAT-6; estão relacionados de alguma forma à inflamação pulmonar e à hiper-responsividade brônquica, e na última década tornaram-se alvos na busca de respostas para o entendimento da asma (MAUAD et al, 2008; GENOV et al, 2006; HOLTZMAN, 2012; SILVA e DIAS, 2013).

Fatores ambientais alergênicos comuns, tais como: ácaro caseiro, pólen, descamação de pelo de animais domésticos como cão e gato, partículas de baratas, fungos, mofos e leveduras, são muito citados na literatura sobre asma, devido ao seu alto nível de exposição cotidiana, seu difícil controle no ambiente doméstico do



paciente asmático, e muitas vezes a não aceitação por parte do paciente e sua família de que possam realmente ser ponto críticos no controle das exacerbações da doença. O ambiente laboral do paciente asmático, também é um ponto crítico de controle, pois mais de 300 diferentes substâncias também já foram associadas à asma ocupacional (CAMPANHA, 2008; CAMPOS, 2007; GINA, 2014; MARTINEZ e VENCELLI, 2007; SBPT, 2012; SILVA e DIAS, 2013; SILVA e HETZEL, 2011. RODRIGUES, 2007).

Outros fatores agravantes como doença cardíaca, gestação, rinosinusopatia, a doença do refluxo gastroesofágico, doenças virais e fúngicas pulmonares, episódios desencadeados por atividade física e fármacos não esteróides, também são citados como fatores indutores da sensibilização aos alérgenos e da hiper-responsividade brônquica em indivíduos predispostos (SILVA e HETZEL, 2011).

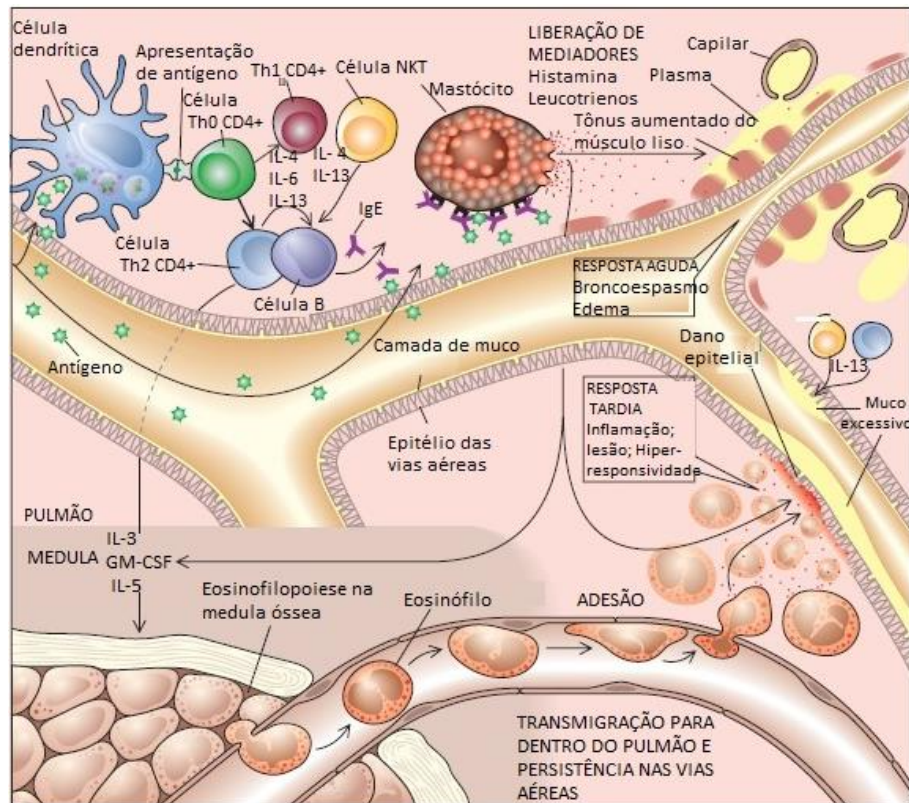
A obesidade também é um fator agravante intrínseco à asma, visto a grande incidência de indivíduos asmáticos nesta condição. Acredita-se que os adipócitos são capazes de liberar mediadores inflamatórios como a leptina, a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), responsáveis pela condição inflamatória sistêmica, facilitando o desenvolvimento da asma (SILVA e DIAS, 2013).

A asma pode ser dividida em asma alérgica e não alérgica (COSTA, 2005; MAUAD et al, 2008; SILVA e HETZEL, 2011). Na asma não alérgica é observada a intensa presença de neutrófilos, sem o aumento do número dos eosinófilos, demonstrando que haverá maior população de células T *Helper* 1 – TH 1, observado em pacientes com histórico clínico de infecções por *Clamídia spp.* ou vírus sincicial respiratório – VSR (NANZER e MENZIES-GOW, 2014; SILVA e DIAS, 2013).

A forma alérgica distingue-se pela predisposição do indivíduo em montar uma resposta baseada na produção de imunoglobulina E (Ig-E) contra a maioria dos alérgenos ambientais comuns (SILVA e DIAS, 2013; SILVA e HETZEL, 2011).

Classicamente, a asma é reconhecida como uma doença de perfil T *Helper* 2 – TH 2, caracterizada por intensa infiltração de eosinófilos e hiper-reatividade das vias aéreas (KUDO et al., 2013), conforme ilustra a figura 02.

Figura 02: Fisiopatologia da asma.



Representação esquemática da cascata inflamatória da asma. O alérgeno inalado é processado pelas células dendríticas e apresentado para as células TH 0. As células B são estimuladas pelas TH 0 e células *Natural Killer* (NK) a produzirem Ig-E, induzindo os mastócitos existentes no parênquima pulmonar, estimulando sua desgranulação e a liberação de mediadores de resposta imediata e tardia. A histamina e leucotrienos induzem o broncoespasmo e edema locais. Os fatores quimiotáticos liberados, aliados aos fatores liberados pelas células TH 2, facilitam o trânsito dos eosinófilos desde a medula óssea até as paredes das vias aéreas. GM-CSF = fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos; IL = interleucina.

Fonte: Holtzman, 2012.

A sensibilização alérgica se inicia quando alérgenos ultrapassam as barreiras físicas do sistema respiratório e penetram nas vias aéreas. Os alérgenos são captados e processados, sendo então apresentados pelas células apresentadoras de antígenos – APC's como as células dendríticas e macrófagos, através do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II – MHC II, às células TH 0 que juntamente a sinais co-estimulatórios levam a ativação dessas células e passam a ter características de células T *Helper* 2 (SILVA e DIAS, 2013; SILVA e HETZEL, 2011), produzindo IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 que influenciarão diretamente no desenvolvimento de hiper-reatividade das vias aéreas, na inflamação e no

remodelamento tecidual (GELLER e SCHEINBERG, 2015; SILVA e DIAS, 2013; SILVA e HETZEL, 2011).

Segundo Geller e Scheinberg (2015), a resposta asmática se divide em fase imediata e tardia, se diferenciando pela ordem temporal e pela qualidade dos eventos. Na fase imediata, o indivíduo sensibilizado entra novamente em contato com o alérgeno, e o antígeno se ligará as Ig-E's associadas aos receptores de alta afinidade das membranas dos basófilos e mastócitos.

Ocorre a desgranulação dessas células e a liberação de aminas vasoativas, histamina principalmente; mediadores lipídicos como prostaglandinas e leucotrienos; dentre outras citocinas e quimiocinas. A histamina induz a broncoconstrição através da contração das células endoteliais e das células da musculatura lisa, com extravasamento do plasma para os tecidos. As proteases neutras, abundantes nos grânulos dos mastócitos, contribuem para o dano tecidual. Citocinas e quimiocinas quando liberadas, participam do recrutamento, ativação e proliferação de outras células da imunidade como linfócitos e eosinófilos.

Os mediadores lipídicos como prostaglandinas, leucotrienos e o fator de ativação plaquetária – PAF, também induzem a vasodilatação, broncoconstrição, secreção de muco, aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia e ativação das demais células tais como: plaquetas, macrófagos e células *NK* (CAMPOS, 2007; SILVA e DIAS, 2013; SILVA e HETZEL, 2011. GELLER e SCHEINBERG, 2015).

Segundo Agrawal e Shao (2010) e Faoud (2011), a fase tardia consiste no acúmulo de infiltrado pulmonar, caracterizado principalmente pela presença de células *T Helper 2*, eosinófilos, mastócitos, células dendríticas e macrófagos, atraídos para esse sítio de liberação de citocinas e quimiocinas da fase imediata.

Observa-se um aumento de eosinófilos sanguíneos e seu recrutamento na medula óssea dos pacientes asmáticos, correlacionando-os com a gravidade da doença, sugerindo que seja uma célula efetora central na inflamação pulmonar da asma. Após sua ativação, a liberação de seus grânulos contendo mediadores inflamatórios e espasmógenos como leucotrienos LTD<sub>4</sub> e PAF, causam broncoconstrição e hipersecreção de muco. As proteínas tóxicas ao epitélio como a proteína básica principal – MBP (*major basic protein*) e a peroxidase eosinofílica – EPO (*eosinophil peroxidase*) provocam a descamação do epitélio e importantes danos neurogênicos (MAUAD et al, 2008).

Em estudos realizados com administração de anticorpos anti IL-5, demonstrou que este procedimento reduziu o número de eosinófilos na mucosa brônquica e promoveu a redução do remodelamento brônquico através da inibição da deposição de pró-colágeno e do fator de crescimento tumoral – TGF- $\beta$ , comprovando a participação dessas células na deposição de proteínas de matriz extracelular na membrana basal reticular. Observou-se também que os eosinófilos são capazes de apresentar antígenos e secretar citocinas que irão amplificar o processo inflamatório (CHOBBY e LEE, 2015. SILVA e HETZEL, 2011).

A contínua resposta inflamatória que envolve o processo patológico da asma favorece a cronicidade e impede o desenvolvimento da sua resolução. Para tal, necessita-se da remoção do estímulo, redução dos mediadores pró-inflamatórios circulantes e “*clerance*” das células danificadas. Estudos demonstram que neutrófilos e outros granulócitos conseguem promover a troca de produção de estímulos pró-inflamatórios, para estímulos anti-inflamatórios e estimulando a apoptose das células, a fim de iniciar o processo de resolução (CHOBBY e LEE, 2015; KUDO et al, 2013; MAUAD et al, 2008. SILVA e HETZEL, 2011).

Segundo Agrawal e Shao (2010), quando as células TH 0 recebem o estímulo de citocinas como o TGF- $\beta$  e a IL-2 ao invés da IL-6, induzirá a formação de células T Reg, que contribuem para a homeostase das vias aéreas, visto sua capacidade de supressão das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ . A IL-10 inibe a resposta das células dendríticas. O TGF- $\beta$  está ligado à regulação das células T e ativação dos macrófagos. As células T Reg também induzem a supressão dos linfócitos e células dendríticas, produzindo moléculas inibitórias tais como CTLA-4 e PD-1, importantes para o controle principalmente para a população de células T (HOTLZMAN, 2012; SILVA e HETZEL, 2011).

E da mesma forma, quando as células T *Helper* 0 forem estimuladas na presença do TGF- $\beta$  ou IL-6, IL-21 e IL-23, ocorrerá a subpopulação das células TH 17, caracterizada pela produção de IL-17 e IL-23, que atuam na determinação da autotolerância e na regulação de respostas imunes (AGRAWALL e SHAO, 2010; SILVA e DIAS, 2013).

As mudanças estruturais que acontecem durante esse complexo processo na parede das vias aéreas, conjuntamente denominadas de remodelamento brônquico, resultam da interação dos mediadores inflamatórios com as células epiteliais ou as células do dano tecidual. Fatores locais, incluindo as células estruturais e a matriz

extracelular, respondem pela inflamação de forma característica e coordenada reparando o dano causado pela inflamação local (CAMPOS, 2007; MAUAD et al, 2008; NANZER e MENZIES-GOW, 2014; RODRIGUES, 2007).

O espessamento da parede das vias aéreas dos pacientes asmáticos pode ser entre 10 a 300%, quando comparado com indivíduos hígidos, determinando uma redução extrema do lúmen. Mesmo as pequenas vias, entre de 2-4 mm, também estão envolvidas na patologia, de acordo com MAUAD et al, 2008.

Além das células inflamatórias, a maioria dos elementos das vias aéreas contribui para o espessamento como as células musculares, fibroblastos, miofibroblastos e miócitos. O desprendimento das células epiteliais, por exemplo, é uma característica marcante das vias aéreas dos pacientes asmáticos, pois esse tipo celular apresenta maior taxa de apoptose nos asmáticos do que em indivíduos normais (MAUAD et al, 2008; NANZER e MENZIES-GOW, 2014).

Como parte do processo de remodelamento ocorre o aumento das glândulas das submucosas, hipertrofia das células caliciformes secretoras de muco e metaplasia do epitélio das vias aéreas, que passam a secretar muco também. As interleucinas 9 e 13 podem induzir a hipersecreção de muco, culminando na obstrução das vias aéreas. A camada sub-epitelial também fica mais espessa em indivíduos asmáticos devido a ativação de fibroblastos pelo TGF- $\beta$  produzido tanto pelas células estruturais quanto pelas células inflamatórias como macrófagos e células dendríticas (MAUAD et al, 2008 e OLSEN, 2011).

Os fibroblastos ativados aumentam a deposição de matriz extracelular, como o colágeno do tipo I, III e V; fibronectina e tenascina abaixo da membrana basal, na "*lâmina reticularis*". Os miofibroblastos produtores de colágeno também se encontram hiperplásicos, bem como as células musculares, passando a ocupar até três vezes a área que ocupa em indivíduos saudáveis, ocorrendo na presença de estímulos inflamatórios ou mitogênicos, como o TGF- $\beta$ , o leucotrienos D4, e espécies reativas de oxigênio (SILVA e DIAS, 2013; MAUAD et al, 2008; NANZER e MENZIES-GOW 2014; RODRIGUES, 2007).

Também ocorre dilatação dos vasos sanguíneos e angiogênese, aumento da permeabilidade vascular e edema das paredes das vias aéreas. O aumento da vascularização nos pulmões dos asmáticos esta associado ao aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular – VEGF, o qual induz edema (DIAS e SILVA, 2013; MAUAD et al, 2008).

Essas alterações estruturais modificam a arquitetura da via aérea, tornando-a mais espessa, menos complacente e reduzindo seu lúmen. Todas essas características estão associadas com o aumento de constrição da via aérea, quando estimulada. A inflamação também parece estar associada neste momento, porém não sendo mais possível dissociá-la do remodelamento em “causa e efeito” (CAMPOS, 2007; MAUAD et al, 2008; NANZER e MENZIES-GOW 2014; OLSEN, 2011; RODRIGUES, 2007).

Tais alterações culminam em um componente de irreversibilidade da limitação ao fluxo de ar, que é visto principalmente em pacientes refratários aos medicamentos comumente prescritos pelas diretrizes mundiais (MAUAD et al, 2008) e a necessidade de renovação/aprimoramento do arsenal terapêutico para o tratamento da asma se faz importante numa Instituição como a Fiocruz cuja missão é: *“Produzir, disseminar e compartilhar conhecimentos e tecnologias voltados para o fortalecimento e a consolidação do Sistema Único de Saúde (SUS) e que contribuam para a promoção da saúde e da qualidade de vida da população brasileira, para a redução das desigualdades sociais e para a dinâmica nacional de inovação, tendo a defesa do direito à saúde e da cidadania ampla como valores centrais.”*

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade – INCQS, é uma das unidades técnico-científicas da Fiocruz, e na descrição de suas atividades institucionais se compromete em além de executar ações analítico-laboratoriais previstas na legislação sanitária ou por demanda de órgãos oficiais; a também auxiliar no desenvolvimento de metodologias analíticas aplicadas à verificação da qualidade de produtos de saúde; bem como promover a contínua discussão, atualização, aprimoramento e divulgação dos conceitos e metodologias em sua área de atuação.

A contribuição no desenvolvimento de novas tecnologias é de suma importância no contexto institucional da Fiocruz, permitindo a interação das unidades num processo de mútua ajuda, engrandecendo a pesquisa científica.

### 1.3 TRATAMENTOS PRECONIZADOS PELO SUS

O Ministério da Saúde reconhece a asma como um importante problema de saúde pública, e a partir dos anos 90 inicia-se a implantação de programas de

controle da doença, tanto na esfera municipal atuando na Atenção Básica, quanto na esfera estadual com as hospitalizações nos casos de exacerbações dos pacientes graves, com bastante êxito em suas atividades (AMARAL et al, 2012; NETO, 2007).

O SUS passa então a adotar em 1996 a partir do I Congresso Brasileiro de Educação em Asma, as Diretrizes para o Manejo da Asma da SBPT elaborada em consonância com as recomendações da GINA, cujos aspectos principais do tratamento são: controlar os sintomas através da intervenção farmacológica planejada entre médico e paciente; prevenir a limitação do fluxo aéreo e o remodelamento brônquico; permitir o retorno às atividades cotidianas como o trabalho, escola e lazer; reduzir idas às emergências e hospitalizações, reduzir a necessidade do uso do broncodilatador para alívio evitando os efeitos colaterais da medicação e evitar o óbito (NETO, 2007).

De acordo com Damasceno e colaboradores (2012) o número de beneficiários que receberam medicamentos contra a asma gratuitamente aumentou no período de junho a setembro de 2012, de 48.495 para cerca de 263 mil pessoas, o que corresponde a um crescimento de 443% na aderência ao programa, a partir da implementação do “Programa Saúde não tem Preço”, ação integrante do “Programa Farmácia Popular” do Ministério da Saúde, com fornecimento gratuito de brometo de ipratrópio, dipropionato de beclometasona e sulfato de salbutamol.

Assim, segundo Santos e colaboradores (2009), o melhor controle da asma influencia diretamente o valor dos custos totais reduzindo os gastos com a utilização de recursos de saúde. A distribuição gratuita de medicamentos para a asma induz uma maior adesão ao tratamento domiciliar e tende à diminuição do número de exacerbações da doença e, conseqüentemente, a um número menor de visitas ao pronto-socorro, devido ao melhor controle da doença.

Nas recomendações terapêuticas adotadas pelo SUS, de acordo com as Normas e Manuais Técnicos Cadernos de Atenção Básica, nº 25: DOENÇAS RESPIRATÓRIAS CRÔNICAS de acordo com a IV Diretrizes para o Manejo da Asma da SBPT (2012) e GINA (2014), apresentadas na figura 03, o tratamento é baseado na classificação da gravidade e a resposta clínica ao tratamento.

Figura 03: Recomendações da SBPT, para o tratamento inicial da asma baseado na gravidade

Gravidade	Alívio	Primeira Escolha	Alternativa	Uso Corticoide Oral
<b>Intermitente</b>	Beta2 de curta duração	Sem necessidade de medicamento de manutenção		
<b>Persistente Leve</b>	Beta2 de curta duração	CI dose baixa	Montelucaste Cromonas *	Corticosteroide oral nas exacerbações graves
<b>Persistente Moderada</b>	Beta2 de curta duração	CI dose moderada (*) a alta ou CI dose baixa a moderada associado a LABA	Baixa a moderada dose de CI associada anti-leucotrieno ou Teofilina	Corticosteroide oral nas exacerbações graves
<b>Persistente Grave</b>	Beta2 de curta duração	CI dose alta (*) CI dose alta + LABA	Alta dose de CI + LABA associada anti-leucotrieno ou Teofilina	Cursos de corticoide oral a critério médico na menor dose para atingir o controle

\* especialmente em crianças menores de 4-6 anos

CI: Corticosteróide Inalatório; LABA: Betabloqueador de longa ação.

Fonte: SILVA, 2008.

Devido ao seu caráter complexo, e diante das diferenças de susceptibilidade genética e fatores ambientais envolvidos, a monoterapia farmacológica nem sempre é eficiente (OLSEN, 2011 e SBPT, 2012). Por isso a associação de fármacos tem sido a melhor e mais utilizada opção na prevenção e reversão da inflamação brônquica, bem como o relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas.

### 1.3.1 Glicocorticóides

Segundo Torres e colaboradores (2012), os glicocorticóides são os fármacos mais utilizados e mais eficazes no tratamento de várias doenças inflamatórias e imunológicas, incluindo asma, dermatites, artrite reumatóide e alguns casos de câncer. São hormônios produzidos naturalmente pelas adrenais, onde sua regulação da síntese e, conseqüentemente, dos níveis circulantes é feita através do eixo Hipotálamo–Hipófise-Adrenal (HHA).

Ao penetrarem por difusão nas células-alvo, ligam-se aos chamados receptores de glicocorticóide-GR no citoplasma (OLSEN, 2011 e TORRES et al,



2012), sofrendo uma modificação conformacional e formando dímeros que migrarão para o núcleo da célula, e se ligarão em determinadas regiões do DNA, a fim de suprimir a expressão de proteínas pró-inflamatórias, ou ainda aumentar expressão de proteínas anti-inflamatórias. O controle pode ser obtido através da inibição dos diversos fatores de transcrição como o AP-1 (ativador protein-1) e o fator nuclear kappa B – NFkB, que estão normalmente ativos no caso da asma. (OLSEN, 2011).

O uso de glicocorticóides em pacientes com asma diminui ação das células T CD4 e na sua proliferação devido à inibição da transcrição do gene IL-2. A produção de prostanoídes é reduzida também durante a utilização desse fármaco por causa da inibição da transcrição do gene da ciclooxigenase-2 (COX-2), diminuindo a expressão das citocinas do perfil TH 2 e outras quimiocinas permitindo a redução do recrutamento, maturação e ativação de eosinófilos e mastócitos (COSTA, 2005; OLSEN, 2011; SBPT, 2012).

Muitas vezes utiliza-se a associação de glicocorticóides inalados com os de uso oral, a fim de se reduzir a gravidade e a frequência das crises, pois os glicocorticóides inalatórios iniciam rapidamente sua ação anti-inflamatória na mucosa respiratória, principalmente nas porções iniciais da árvore brônquica, havendo diminuição significativa de eosinófilos e da hiper-responsividade das vias aéreas. A via inalatória de administração permite atingir níveis plasmáticos que preocupam quanto ao risco dos efeitos adversos aos que são usados de forma sistêmica. Os efeitos colaterais estão associados principalmente ao seu uso em altas doses e administração prolongada. Em linhas gerais, tanto o uso sistêmico quanto o uso inalatório podem causar efeitos adversos sistêmicos, visto o uso inalatório ser absorvido de forma semelhante pela corrente sanguínea (BICHARD e SHERDING, 1998 e TORRES et al, 2012).

Segundo Torres e colaboradores (2012), Olsen (2011) e Costa (2005), os principais efeitos colaterais sistêmicos dos glicocorticóides decorrentes do uso crônico são: osteoporose e fragilidade óssea, atrofia muscular e miopatias, dislipidemia, hipertensão, resistência à insulina e hiperglicemia, atraso no fechamento das epífises ósseas em crianças, diminuição da libido, hipocalcemia, irritação gástrica e úlcera péptica, glaucoma, catarata, distúrbios do sono, irritabilidade, depressão e estigmas cushingóides. Embora sejam menos graves, os efeitos adversos locais são mais frequentes do que os efeitos sistêmicos. Aos

glicocorticóides inalados também são atribuídos sintomas como rouquidão, disfonia e fragilidade na voz.

Outro importante efeito colateral ao uso dos glicocorticóides é a síndrome da retirada, quando há a necessidade de retirada ou redução desse fármaco, e ocorre a supressão do eixo HHA levando a insuficiência adrenal secundária devido à atrofia das adrenais e cuja sintomatologia de acordo com Alves e colaboradores (2008), cursa com anorexia, náusea, vômito, dor abdominal, fraqueza, cansaço, astenia, prostração, mialgia, artralgia, perda de peso, hipotensão postural, sonolência e depressão. Desta forma, a tomada de decisão em se interromper ou diminuir o uso dos corticóides deve ser avaliada de acordo com o equilíbrio entre os benefícios no controle da asma e a severidade dos seus efeitos adversos (ALVES et al, 2008; GOODMAN e GILMAN, 2006).

### 1.3.2 Agonistas dos receptores adrenérgicos

Os  $\beta$ -agonistas adrenérgicos são agonistas fisiológicos que atuam na broncodilatação desde a traqueia até os bronquíolos terminais (OLSEN, 2011 e SBPT, 2012). Previnem e revertem os efeitos de substâncias broncoconstritoras como as prostaglandinas, acetilcolina, bradicinina, histaminas, endotelinas e LTD<sub>4</sub>; estimulam a adenilciclase e aumentam a síntese de AMP-cíclico (GOODMAN e GILMAN, 2006).

Os agentes de curta duração (BACA's) devem ser utilizados apenas como terapia de manutenção, devido aos efeitos adversos em outras regiões do organismo que tenha musculatura estriada, podendo causar taquicardia, taquipnéia e tremores das extremidades. Deve-se utilizar a via inalatória a fim de evitar os seus efeitos sistêmicos. Nesta classe estão incluídos: salbutamol, albutarol e terbutalina (CAMPOS e CAMARGOS, 2012; GOODMAN e GILMAN, 2006; SBPT, 2012; SILVA, 2009).

Os agentes de longa duração (LACA's), com ação de 12 horas ou mais devido a sua alta lipossolubilidade, em estudo *in vitro* sugere-se que ativam o receptor de glicocorticóides (RG), associando um aumento no efeito anti-inflamatório, sendo bastante utilizado em associação com glicocorticóides (OLSEN,

2011). Nesta classe estão incluídos: salmeterol e formoterol (GOODMAN e GILMAN, 2006; SBPT, 2012; SILVA, 2009).

### 1.3.3 Anticolinérgicos

Agem nos receptores muscarínicos nas células musculares lisas das vias aéreas inibindo a liberação da acetilcolina, e segundo Goodman e Gilman (2006) estas podem ser liberadas pelo estímulo vagal, pelas próprias células epiteliais do tecido brônquico e pelas células inflamatórias como eosinófilos e macrófagos. São considerados medicamentos de segunda linha, pois os beta-agonistas são mais efetivos.

Geralmente tem seu uso associado com os BACA's, beneficiando pacientes em broncoconstrição aguda (CHOBY e LEE, 2015). O atualmente usado é o brometo de ipratrópio (GOODMAN e GILMAN, 2006). Tem como efeitos adversos os sintomas comuns aos agentes anticolinérgicos conforme a bula do medicamento comercial no Dicionário de Especialidades Farmacêuticas – DEF (2015) tais como: cefaleia, tontura, tosse, boca seca, náusea e distúrbios da motilidade gastrointestinal, estomatite, midríase, aumento da pressão intraocular; taquicardia supraventricular, broncoespasmo paradoxal, estomatite, *rash* cutâneo e , prurido, angioedema e retenção urinária (CAMPOS e CAMARGOS, 2012).

### 1.3.4 Metilxantinas

A teofilina e a aminofilina são estruturalmente relacionadas à cafeína, utilizadas há pelo menos 70 anos e são broncodilatadores de baixa potência (COSTA, 2005; OLSEN, 2010). Atuam inibindo a degradação de AMP-cíclico intracelular, cujo acúmulo provoca broncodilatação, através da inibição da família das enzimas fosfodiesterase, que reduz a liberação de mediadores pró-inflamatórios pelos mastócitos e induzindo a apoptose de neutrófilos e eosinófilos. Segundo Goodman e Gilman (2006) em comparação com os BACA's, possuem menor

eficácia e maior frequência de efeitos adversos. Pode-se administrá-la ao paciente que se mantém sintomático com o uso do corticoide inalatório isolado potencializando seu efeito. O uso deve ser cuidadoso, visto a concentração terapêutica ser próxima da tóxica, devendo-se monitorar os níveis séricos (CAMPOS e CAMARGOS, 2012).

Como efeitos adversos são citados distúrbios gastrointestinais (náuseas, vômitos), arritmias cardíacas, cefaleia e crise convulsiva generalizada (GOODMAN e GILMAN, 2006; SBPT, 2012; SILVA, 2009).

### 1.3.5 Cromonas

As cromonas são conhecidas como estabilizadores de mastócitos e impedem a liberação de histamina, por mecanismos de ação pouco conhecidos. Porém sabe-se que reduzem a inflamação das vias aéreas quando há mecanismos neurogênicos associados à hiper-reatividade. São bastante usadas nos casos de asma leve, em associação a baixas doses de glicocorticoides sistêmicos. As cromonas são consideradas pouco eficazes como monoterapia devido o seu curto tempo de ação, necessitando ser inaladas por quatro vezes ao dia, tornando inviável o seu uso. Os mais conhecidos são o cromoglicato de sódio e o nedocromil sódico. Como efeito colateral, cita-se a irritação das vias aéreas no momento do uso (GOODMAN e GILMAN, 2006; OLSEN, 2011).

### 1.3.6 Antagonistas dos receptores de leucotrienos

São antagonistas dos receptores de leucotrienos, auxiliando na diminuição de broncoconstrição e na eosinofilia através do bloqueio do receptor CysL1 (monteleucaste, pranlucaste e zafirlucaste) e inibindo a 5-lipoxigenase (zileuton). Os mais utilizados atualmente são montelucaste e zafirulcaste. Indicados apenas para adultos, seu custo ainda é elevado e menos eficientes do que os corticóides em baixas doses (GOODMAN e GILMAN, 2006; SBPT, 2012; SILVA, 2008), porém

quando utilizados em associação aos glicocorticóides, permitem a redução da quantidade do último, havendo melhor proveito da ação dos dois medicamentos para o controle da asma em casos que mesmo em doses altas o glicocorticóide sozinho não é eficiente. Em pacientes com deficiências no sistema hepático da enzima P-450, seu uso é indicado apenas com monitoração constante das transaminases (CHOBY e LEE, 2015).

### 1.3.7 Anticorpo monoclonal anti-IgE

Atualmente disponível é o omalizumabe, anticorpo monoclonal humanizado, que se liga seletivamente à Ig-E circulante no plasma, impedindo-a de se ligar aos receptores de alta afinidade na superfície dos mastócitos e basófilos, prevenindo a liberação de mediadores inflamatórios tais como IL-2, IL-4, IL-5 e IL-13. Segundo Goodman e Gilman (2006) há uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes, devido à redução dos sintomas causados pela diminuição sérica de Ig-E, porém como desvantagem o custo, impedindo a recomendação médica em larga escala e a necessidade de monitoramento e uso por tempo indeterminado (SILVA, 2009).

## 1.4 NOVAS PROPOSTAS TERAPÊUTICAS

A asma é uma doença de prevalência crescente, com dimensões de um problema de saúde pública e datas específicas acordadas com o GINA-Brasil e outras entidades brasileiras com o objetivo de transmitir informação sobre a doença. Apesar dos avanços científicos, em média 2.500 pessoas morrem vítimas da asma por ano no Brasil (RODRIGUES, 2007).

A melhora nos tratamentos para asma exigem esforços dos pesquisadores, dos profissionais da saúde, familiares e dos sistemas de assistência médica públicos e privados. Mesmo com os conhecimentos disponíveis, permanece a necessidade crítica de desenvolvimento de novos fármacos que visem reduzir sua morbidade,

seus custos associados e, principalmente, garantir a qualidade de vida para os pacientes (CAMPOS, 2007).

A terapia atual, recomendada pelas diretrizes mundiais e fornecida pelo SUS, pela característica complexa da doença, necessita ser abrangente com uso de alguns grupos de fármacos, devendo-se ter o cuidado com suas dosagens e interações medicamentosas, o que por vezes pode ser de difícil compreensão do paciente (COSTA, 2005).

Muito conhecimento já foi gerado, e é inegável que a terapia associada atual é capaz de controlar a maioria dos pacientes asmáticos. Porém, uma parcela ainda continua sintomática, e sem possibilidade de conseguir reverter muitas das disfunções (RODRIGUES, 2007).

#### 1.4.1 Termoplastia

A termoplastia ainda é um procedimento experimental, e segundo Rubim e Cardoso (2010) estudos indicam que a sua principal utilização será em pacientes com asma grave e asma de difícil controle, cujos tratamentos baseados nas diretrizes da SBPT e GINA, não alcançam o eficaz controle da doença.

É um método de ablação, que consiste em aplicação de calor gerado e controlado por radiofrequência, através do cateter de broncoscopia, que visa reduzir a quantidade e contratilidade do músculo liso das vias respiratórias. Reduz a hiperreatividade brônquica, melhorando a função pulmonar, a qualidade de vida e necessidades terapêuticas de pacientes com asma (FERNÁNDEZ, 2010 e SILVA, 2009).

O tratamento experimental consiste em três sessões intercaladas por intervalos de três semanas, envolvendo o preenchimento de um mapa cumprindo uma sequência pré-determinada: a primeira sessão no lobo inferior direito, a segunda no lobo inferior esquerdo e a terceira nos lobos superiores direito e esquerdo. O lobo médio nunca é tratado. As sessões consistem em média de 30-45 ativações do aparelho com duração de 30-60min. Porém, como desvantagem, cita-se o fato de ser realizado somente sob sedação simples utilizando-se midazolam por exemplo, ou em anestesia geral com o uso de propofol. O procedimento é

considerado tecnicamente correto quando todas as vias aéreas distais aos brônquios principais, com calibre entre 3 e 10 mm, tiverem sido tratadas, excetuando o lobo médio (FERNÁNDEZ, 2010; RUBIN e CARDOSO, 2010).

Ainda não há dados sobre a aprovação desse procedimento junto às agências reguladoras nacionais e internacionais, bem como seus custos, ou mesmo que tenha sido determinado qual subgrupo de asmáticos graves obterá maior benefício como tratamento e em quais pacientes o tratamento deverá ser contraindicado (RUBIN e CARDOSO, 2010).

#### 1.4.2 Anestésicos locais

Ao final da década de 90, pesquisadores demonstraram acidentalmente que a lidocaína possuía efeito miorrelaxante, devido às observações feitas em broncoscopias de pacientes asmáticos ou com hiper-reatividade brônquica, bem como observaram que não havia esse mesmo tipo de resposta terapêutica em outra classe de anestésicos utilizados para este procedimento. Groeben e colaboradores (2000), em seus estudos constataram que a broncoconstrição induzida pela histamina em modelo experimental humano foi atenuada pela inalação de lidocaína, e mais significativamente atenuada quando em associação ao salbutamol.

A partir dessas evidências, Serra e colaboradores (2012), observaram em seus resultados que a lidocaína nebulizada impede a inflamação eosinofílica das vias aéreas, a hiper-reatividade bronquial, e a remodelação pulmonar pela depleção simultânea de citocinas TH-2, como as IL-4, IL-5 e IL-13, bem como a eotaxina-1, por um mecanismo relacionado com a regulação negativa da expressão do gene GATA-3.

Os fármacos anestésicos passaram então a ser utilizados como protótipos para fármacos que permitam a modulação biológica e/ou anti-inflamatória, tentando-se reduzir a atividade anestésica e aumentar ação espasmolítica, além de tentar a obtenção de moléculas com menor toxicidade (COSTA, 2005).

### 1.4.3 Análogo do antiarrítmico mexiletina: a molécula JME-173

A mexiletina é um agente antiarrítmico da classe IB, similar em estrutura e a atividade à lidocaína, utilizada para tratamentos de manutenção de arritmias graves e supressão de contrações ventriculares prematuras. É rápida e quase completamente absorvida pelo trato gastrointestinal após administração oral, e é amplamente distribuída pelo organismo, devido às suas propriedades físico-químicas de amina primária, e por sua alta lipofilia (DEF, 2015; GOODMAN e GILDMAN, 2006; ROENN et al, 2011).

Tem seu uso bastante difundido em casos de dor crônica e de acordo com Roenn e colaboradores (2011), a dose recomendada nas situações de dor intensa é de 10 mg/kg/dia, quando nos tratamentos de arritmias não se deve exceder 1200 mg/dia dividida em três tomadas. Possui baixo índice de toxicidade, de acordo com a bula do medicamento comercial que possui a mexiletina como base farmacológica, o Mexitil® (DEF, 2015) os valores da DL<sub>50</sub> em camundongos, ratos, coelhos, cães e/ou gatos após administração oral estão entre 80 e 646 mg/kg.

Na Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz – IOC desenvolveram um grupo de moléculas análogas da mexiletina denominadas “JME”, cujo pedido de patente encontra-se depositado no IPNI sob registro nº P1812, com maior potência de relaxamento da musculatura lisa respiratória e acentuada ação anti-inflamatória, quando comparada a mexiletina (FIOCRUZ, 2013).

Na molécula denominada JME-173, observou-se uma menor atividade nos canais de sódio, e possivelmente a mesma seja desprovida de reações adversas presentes em outros fármacos da mesma classe terapêutica, tais como os anestésicos locais e antiarrítmicos, sendo uma inovação no tratamento antiasmático (FIOCRUZ, 2013).

Segundo Olsen e Martins (2012), os estudos com esse grupo de moléculas desenvolvidas demonstraram a clara separação entre a ação anestésica e a atividade anti-inflamatória/broncodilatadora desse grupo de análogos da mexiletina, reforçando a perspectiva de que essas novas moléculas possam ganhar aplicabilidade terapêutica dentro do arsenal antiasmático, sendo necessárias mais



pesquisas acerca do seu mecanismo de ação, bem como a garantia da segurança no seu uso.

## 1.5 REGULAMENTAÇÃO PARA NOVOS MEDICAMENTOS

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA é o órgão governamental responsável pela regulamentação de novos fármacos, utilizando-se de documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos como o *Food and Drug Administration* – FDA e de organizações de interesse na área tais como: *International Council on Harmonisation* - ICH, *Organisation for Economic Co-operation and Development* – OECD, *World Health Organization* – WHO, visando uma maior harmonização com a regulamentação internacional (ANVISA, 2013).

A ANVISA, em suas atribuições de registro de medicamentos e análise de pedidos de patentes relacionados a produtos e processos farmacêuticos, em atribuição conjunta com o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, utiliza-se da Resolução de Diretoria Colegiada – RDC Nº 136 de 23 de maio de 2003, que instrui sobre a obrigatoriedade da apresentação de relatório dos seguintes ensaios não clínicos para o registro de novos medicamentos: toxicidade aguda, sub-aguda e crônica, toxicidade reprodutiva, atividade de mutagênica/genotóxica e potencial oncogênico.

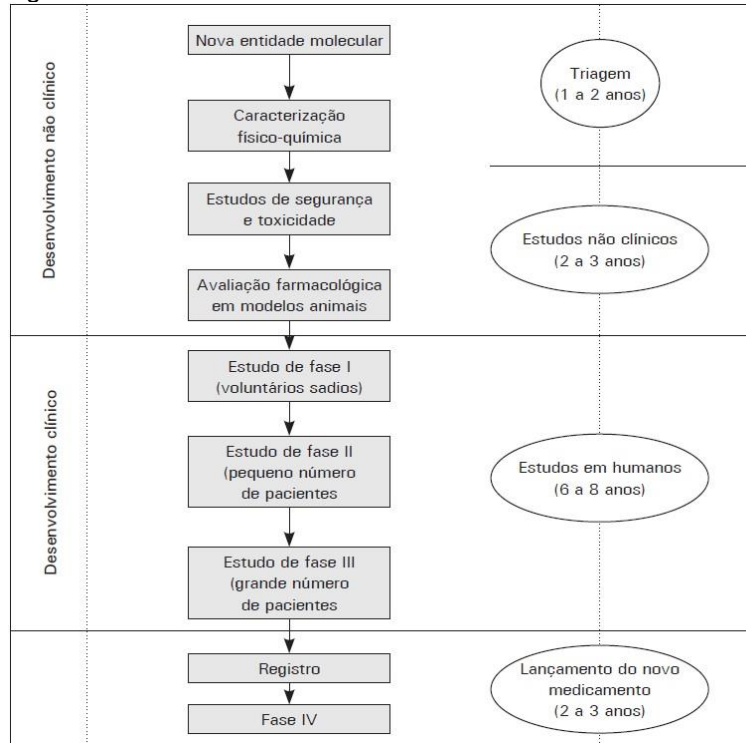
Os ensaios não clínicos, pré-clínicos ou de Fase 0, são os que precedem os testes em humanos, fornecem dados importantes e confiáveis para a continuidade da pesquisa clínica (ANVISA, 2013), sendo a avaliação da toxicidade o primeiro teste não clínico a ser realizado, pois tem o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos de causar danos à saúde humana. São investigados parâmetros para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação dose-resposta (SANTOS, 2012).

A descoberta de um novo fármaco e seu desenvolvimento é sempre um processo complexo e custoso, exigindo trabalho em equipe, especialistas de várias áreas do conhecimento e compromisso contínuo com a pesquisa científica. (ROCCO et al, 2012; VIEIRA et al, 2013).

De forma geral, esse processo dura em média 14,2 anos, conforme ilustra a figura 04, dividindo-se em três etapas, distintas entre si, conforme sugere Vieira e colaboradores (2013): descoberta, desenvolvimento e registro no órgão regulador.

De acordo com Vieira e colaboradores (2013), a fase dos estudos não clínicos é a mais crítica, pois é o momento de gerar informações suficientemente importantes que justifiquem a continuidade das pesquisas, e iniciar a fase de desenvolvimento de testes em humanos, iniciando a fase clínica.

Figura 04: Fases do desenvolvimento de novos medicamentos.



Fonte: Vieira e colaboradores, 2013.

Segundo o Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos da ANVISA, o teste de toxicidade oral de dose única (aguda) é definido como aquele utilizado para avaliar a toxicidade produzida por uma droga quando esta é administrada por via oral em uma ou mais doses, num período não superior a 24 horas, com observação dos animais por 14 dias após a administração. Este documento foi elaborado baseado em documentos de agências internacionais reconhecidas pela ação de vigilância

sanitária de medicamentos e outras instituições de interesse na área como, por exemplo, a FDA, OECD, ICH, WHO, no intuito de promover harmonização com a regulamentação internacional, bem como a utilização desnecessária de animais afim de não comprometer a obtenção e a confiabilidade de informações referentes à segurança da droga a ser testada (VALADARES, 2006; SANTOS, 2012).

De acordo com a orientação dos guias da ANVISA e da OECD N°420, a substância deve ser administrada por via oral a um grupo de animais em doses definidas. A ausência ou presença de mortalidade dos animais tratados em um passo irá determinar a realização de uma segunda etapa com outro grupo na próxima dose mais alta (ou a próxima dose mais baixa, caso o *start* do teste seja numa dose que não seja a inicial preconizada), conforme o anexo 02.

Para a classificação da toxicidade oral aguda, são utilizadas cinco categorias segundo a GHS (do inglês *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*), conforme descreve a Associação Brasileira da Indústria Química - ABQI (2005) no quadro 01. Dessa forma, é possível obter informações iniciais sobre a sua toxicidade permitindo a classificação da substância (OECD, 2001).

Quadro 01: Classificação das substâncias de acordo com o GHS, para uso oral.

<b>Toxicidade Aguda</b>	<b>Categoria 1</b>	<b>Categoria 2</b>	<b>Categoria 3</b>	<b>Categoria 4</b>	<b>Categoria 5</b>
Oral (mg/kg)	< 5	>5 e < 50	>50 e < 300	>300 e < 2000	>2000

Fonte: adaptado de ABIQ, 2005.

O GHS é uma abordagem lógica e abrangente para a definição dos perigos dos produtos químicos; e permite a criação de processos de classificação que usem os dados disponíveis sobre os produtos químicos que são comparados a critérios de perigo já definidos, e a comunicação da informação de perigo em rótulos e a Ficha de Informação de Segurança para Produtos Químicos – FISPQ. Os princípios do GHS estão detalhados no Livro Púrpura, editado pela *United Nations Economic Commission for Europe* (ABIQ, 2005).

No Brasil, com a publicação da norma ABNT – NBR 14725:2009, os produtos constituídos de substâncias puras já devem ser obrigatoriamente classificados, rotulados e com FISPQ de acordo com o GHS, a partir de fevereiro de 2011, e os produtos constituídos por misturas, a partir de junho de 2015. Além disso, a obrigatoriedade de se classificar e rotular todos os produtos químicos já existe desde 1998 (ABIQ, 2005).

## 2 OBJETIVO

Avaliar a toxicidade aguda por via oral do análogo da mexiletina JME-173, com base nos guias da OECD Nº 420 e o Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos da ANVISA.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

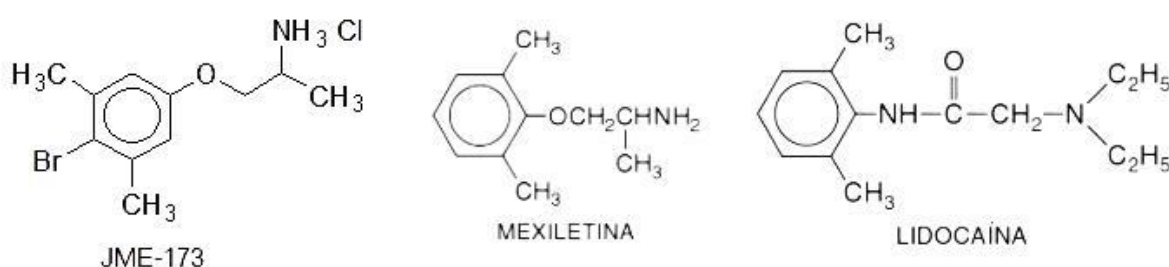
- ✓ Observar possível atividade tóxica do análogo da mexiletina JME 173, através da observação dos sinais clínicos pré-estabelecidos e certificação de óbito, em Ratos Wistar e Coelhos Nova Zelândia albino, em machos e fêmeas, 14 dias após a administração por via oral em dose única.
- ✓ Avaliar o ganho de peso e ingestão alimentar em Ratos Wistar e Coelhos Nova Zelândia albino, em machos e fêmeas, 14 dias após a administração por via oral em dose única do análogo da mexiletina JME-173.
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda oral em Ratos Wistar e Coelhos Nova Zelândia albino; em machos e fêmeas, através das análises séricas bioquímica e hematológica, 14 dias após a administração por via oral em dose única do análogo da mexiletina JME-173.
- ✓ Verificar as alterações anatomopatológicas através do exame macroscópico e da mensuração do peso dos órgãos isolados absoluto e relativo, em Ratos Wistar e Coelhos Nova Zelândia Albino; em machos e fêmeas, 14 dias após a administração por via oral em dose única do análogo da mexiletina JME-173.
- ✓ Correlacionar os resultados obtidos nas avaliações propostas, buscando uma investigação mais completa quanto à segurança e os danos que possam ser induzidos pelo análogo da mexiletina JME-173.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 SUBSTÂNCIA TESTE: JME-173

A molécula denominada JME-173, desenvolvida pela equipe do IOC em parceria com o Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos da Fiocruz, é um análogo à mexiletina (figura 05), da classe das ariloxi-alkil-aminas com atividade biológica associada a propriedades anti-inflamatórias e broncodilatadoras. Possui peso molecular 294,62 e está na forma de cloridrato, por isso é muito solúvel em água (FIOCRUZ, 2013).

Figura 05: Fórmulas estruturais da molécula JME173 e dos seus congêneres lidocaína e mexiletina.



Fonte: Adaptado de FIOCRUZ, 2013; Goodman e Gilman, 2005.

A molécula JME-173 foi entregue para a realização do presente trabalho, pelos responsáveis por sua concepção e síntese, em apresentação de pó cristalino em frasco âmbar, sendo orientado que fosse diluída em solução salina estéril imediatamente antes do uso (FIOCRUZ, 2013; OLSEN et al, 2011).

### 3.2 OS ANIMAIS UTILIZADOS

Conforme as orientações do Guia de Ensaios Não Clínico da ANVISA e do Guia da OECD nº 420, que apontam a necessidade dos estudos e reconduzido utilizando-se uma espécie roedora e uma não roedora, no presente estudo foram selecionadas as espécies rato Wistar e coelho Nova Zelândia Albino, por serem modelos consagrados em toxicologia (LAPCHIK et al, 2009; OECD, 2001).

Todos os animais foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório – CECAL da Fiocruz. Ambas as espécies utilizadas possuem o status genético conhecido como *outbred*, e condição sanitária denominada convencional controlada.

Os ensaios foram realizados no Serviço de Animais de Laboratório - SAL, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS. Todos os animais passaram por um período de aclimatação de 48 horas antes da administração da molécula JME-173, e foram alojados em gaiolas individuais para a correta avaliação dos parâmetros clínicos e mensuração da ingestão alimentar.

Os animais foram mantidos em estantes ventiladas, que possuem características físicas de um ambiente de fluxo de ar coletivo, com termômetro digital para a tomada de leitura da temperatura interna e um controlador de uso dos filtros de ar. Em cada estante ventilada para coelhos, foram mantidas 06 gaiolas de aço inoxidável de tamanho 45 x 60 x 40 cm; e em cada estante ventilada para ratos foram mantidas 24 caixas de polipropileno de tamanho 29 x 12 x 17 cm.

Todos os animais foram mantidos sobre as condições ambientais de temperatura entre 18 a 22° C para os coelhos e entre 20 a 24° C para os ratos; com umidade relativa do ar entre 50 a 90%, e ciclo claro-escuro de 12 horas.

A troca de água foi feita diariamente, e fornecida *ad libitum*, exceto nas horas de jejum que antecederam o momento de administração da molécula JME-173, em bebedouros do tipo mamadeira, de polipropileno autoclavável, com rolha de borracha nitrílica com furo vulcanizado e bico em aço inoxidável. Para os ratos, o bebedouro possuía a capacidade de 250 ml, e para coelhos a capacidade era de 1000 ml.

A ração utilizada para ambas às espécies foi da marca Nuvilab®, com as seguintes especificações de suas rotulagens, cujo quadro 02 demonstra

conjuntamente a formulação para a espécie roedora, sem especificar qual gênero e para a espécie lagomorfos.

Quadro 2: Informações do rótulo da ração peletizada da marca comercial Nuvilab®, formulação para Animais de Laboratório: Camundongo/Ratos e Coelhos.

Nutrientes	Níveis de garantia por quilograma do produto	
	Camundongo e Ratos	Coelho
Vitamina A	13000 UI	8000 UI/kg
Vitamina D3	2000 UI	1200 UI/kg
Vitamina E	34 UI	20 UI/kg
Vitamina K3	3 mg/kg	1 mg/kg
Vitamina B1	5mg/kg	2 mg/kg
Vitamina B2	6 mg/kg	6 mg/kg
Vitamina B6	7 mg/kg	2 mg/kg
Vitamina B12	22 mcg/kg	10 mcg/kg
Niacina	60 mg/kg	30 mg/kg
Pantotenato de Cálcio	20 mg/kg	17 mg/kg
Ácido Fólico	1 mg/g	1 mg/kg
Biotina	0,5 mg/kg	0,03 mg/kg
Colina	1900 mg/kg	1400 mg/kg
Sódio	2700 mg/kg	2700 mg/kg
Ferro	50 mg/kg	40 mg/kg
Manganês	60 mg/kg	40 mg/kg
Zinco	60 mg/kg	60 mg/kg
Cobre	10 mg/kg	6 mg/kg
Iodo	2 mg/kg	0,3 mg/kg
Selênio	0,5 mg/kg	0,1 mg/kg
Cobalto	1,5 mg/kg	1 mg/kg
Flúor	80 mg/kg	60 mg/kg
Lisina	12 g/kg	8000 mg/kg
Metionina	4000 mg/kg	2700 mg/kg
Aditivo BHT	100 mg/kg	100 mg/kg

Fonte: Adaptado Nuvilab®

A ração utilizada no presente trabalho foi fornecida pelo próprio CECAL, cuja utilização já era feita no período que os animais se encontravam no biotério de criação, e também foi fornecida *ad libitum* da mesma forma que a água. Para os ratos, a ração era disposta na parte da tampa de inox da caixa de propileno destinada ao alimento, e para os coelhos a ração era disposta em comedouro de inox externo à gaiola.

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação – CEUA/Fiocruz, sob o número LW – 010/05, atendendo à lei nº 11.794 de 11 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008) e aos Princípios Éticos na



Experimentação Animal da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório – SBCAL, conforme anexo 03.

### 3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos pesando entre 180 e 250 g e coelhos entre 1800 e 2000 g, divididos em um grupo controle e quatro grupos experimentais, para cada uma das espécies analisadas, contemplando-se ambos os sexos, totalizando 50 animais (25 machos e 25 fêmeas).

Cada grupo era composto por 10 animais, sendo 05 machos e 05 fêmeas, alojados individualmente, onde as concentrações utilizadas seguiram as doses fixas pré-determinadas nas orientações do guia da OECD N° 420, e foram distribuídos da seguinte forma:

- ✓ Grupo 1: Controle, utilizou-se solução fisiológica (NaCl 0,9%);
- ✓ Grupo 2: JME-173, 5 mg/kg;
- ✓ Grupo 3: JME-173, 50 mg/kg;
- ✓ Grupo 4: JME-173, 300 mg/kg;
- ✓ Grupo 5: JME-173, 2000 mg/kg.

Os animais foram submetidos ao jejum prévio de alimento na noite anterior à administração do fármaco JME-173. Para a administração por via oral, os animais foram contidos mecanicamente, por ser considerada uma técnica de baixo grau de invasividade, com nenhum ou pouco desconforto e/ou estresse, conforme classificação contida na Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (BRASIL, 2016).

Através da sonda de gavagem (figura 06), introduzida na boca do animal e conduzida pelo esôfago, a solução foi dispensada no estômago.

Figura 06: Sonda para gavagem. A usada em ratos e B usada em coelhos.

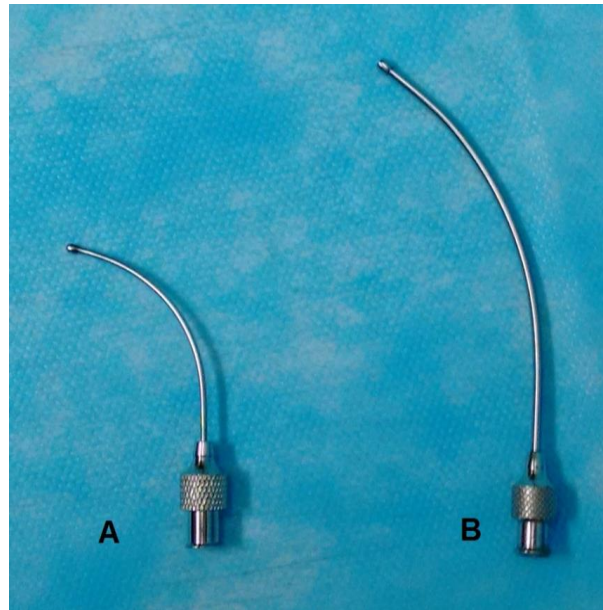


Foto: o próprio autor. 2015.

Cada animal teve sua dose individualizada, de acordo com o peso corporal, cuja anotação foi feita no final do dia anterior ao da administração e o volume final foi ajustado para que não excedesse aos preconizados. Para ratos, o volume final preconizado foi de 1 ml e para coelhos o volume final preconizado foi de 3 ml, respeitando-se assim o limite de 1 ml a cada 100 g de peso do animal, e priorizando o seu bem estar conforme as orientações da CEUA e DBCA.

#### 3.4 PARÂMETROS AVALIADOS:

A escolha dos parâmetros avaliados e os momentos os quais tais análises foram realizadas seguiram as orientações dos guias da OECD 420 e ANVISA, e foi conduzido conforme ilustra a figura 07.

Figura 07: Condução do Teste de Toxicidade Aguda da molécula JME – 173.



#### 3.4.1 Avaliação do peso corporal e ingestão alimentar

O peso corporal foi registrado no dia anterior a administração da substância JME-173 e nos dias 01, 03, 07 e 14 após da administração, sendo anotados em tabela própria. A intenção de analisar este parâmetro foi de além de acompanhar o desenvolvimento do animal frente ao desafio, e dar subsídios reais para a decisão de assumir *endpoint* para o teste.

Para o registro do peso e consumo de ração, nos ratos foi utilizada a balança da marca Acculab® modelo Vicon, com faixa de utilização de 0,01 a 610 g. Já para o registro dos coelhos, foi utilizada a balança da marca Sartorius® modelo U6100, com faixa de utilização de 5 a 6000 g. Ambas devidamente calibradas pelo Setor de Metrologia do INCQS.

A ingestão alimentar foi registrada nos dias 01, 03, 07 e 14 após da administração substância JME-173 e também foram anotadas em tabela própria. A intenção de analisar este parâmetro também foi com o intuito de acompanhar o desenvolvimento do animal frente ao desafio, e também determinar melhor de assumir *endpoint* para o teste.

### 3.4.2 Avaliação dos sinais clínicos

Os animais foram avaliados individualmente após a administração oral, no primeiro dia nos tempos 15 e 30 minutos, e após 01, 02, 04 e 08 horas. Nos 13 dias seguintes foram avaliados uma vez ao dia, totalizando 14 dias de observação.

As anotações a cerca dos sinais clínicos foram realizadas em tabela elaborada especialmente para este trabalho, visto as diretrizes orientativas não serem específicas quanto ao que deveria ser observado. Foi consultada a literatura recente sobre o tema, e estabelecido uma coletânea de sinais clínicos comuns às espécies avaliadas, e outros sinais clínicos comuns aos sinais de toxicidade em geral (CUNNHA, 2009; BICHARD e SHERDING, 1998; MOURA E MATTARAIA, 2009; YUN et al, 2015). Foram anotados na forma binominal SIM e NÃO, conforme demonstra o anexo 04.

A coletânea de parâmetros utilizados para avaliação dos sinais clínicos foi selecionada na tentativa de contemplar a maior gama possível de sinais que pudessem sugerir a condição de toxicidade, e ficaram agrupados da seguinte forma:

Exploração: observar se os animais estão explorando toda a área da caixa;

Frêmito vocal: verificar se os sinais sonoros emitidos pelos animais estão aumentados ou diferentes do normal da espécie;

Resposta ao toque: observar se os animais respondem exageradamente ao estímulo do toque da manipulação;

Resposta a pinçamento da cauda: como auxílio de uma pinça anatômica, faz-se uma pressão moderada na cauda do animal e observa-se a resposta sensitiva de dor;

Ataxia: verificar se há irregularidades das ações musculares ou falta de coordenação na ação de movimentar-se;

Reflexo de endireitamento: verificar se há ausência de propriocepção ao se colocar o animal em decúbito dorsal, direito e esquerdo e observar seu reposicionamento;

Reflexo auricular: verificar se o animal responde a excitação provocada pela ponta da pinça anatômica nas regiões peri-auriculares direita e esquerda, através de movimentação do pavilhão auricular;

Reflexo palpebral: verificar se o animal responde à excitação provocada pela ponta da pinça anatômica nas regiões peri-orbitais medial e lateral de ambos os olhos, através do fechamento das pálpebras;

Straub: observar se o animal apresenta cauda ereta, muitas vezes com a ponta quase tocando a cabeça, devido a espasmo da musculatura próxima à base da cauda e ao redor do ânus, característica dos opiáceos;

Piloereção: observar se há eriçamento dos pelos;

Dacriorréia: verificar se há a presença de secreção ocular, que em geral apresentam tonalidade avermelhada;

Ptoses: observar a ocorrência de fechamento palpebral uni ou bilateral, quando o animal está em atividade;

Micção: verificar se houve aumento ou diminuição da urina eliminada na maravalha;

Defecação: comparar se as fezes expelidas são diferentes em quantidade ou forma, com as do grupo controle.

### 3.4.3 Determinação de *Endpoint*

Os guias de condução utilizados no presente estudo também orientam sobre anotação de anormalidades dos sinais clínicos de toxicidade estabelecidos, a sua duração e reversibilidade, bem como a época do aparecimento, a intensidade, a duração e a progressão dos mesmos (OECD, 2001).

Foi determinado então como *endpoint* para o presente trabalho, conforme cita Frajblat e colaboradores (2008), alguns sinais clínicos que persistissem por mais de 24 horas, tais como: sinais graves de dor cuja postura proprioceptiva esteja arqueada, diminuição do auto-cuidado com acúmulo de sujidade no pelo, ausência de movimentação pelo ambiente, estado respiratório ofegante, diminuição drástica ou cessação da ingestão alimentar e hídrica, além da perda ou o não ganho de peso nas datas de pesagem pré-estabelecidas.

Caso algum animal se encontrasse em qualquer uma dessas circunstâncias, seria encaminhado para a finalização humanitária, que seria feito com a administração da substância anestésica tiopental na dose de três a quatro vezes a utilizada com o intuito de indução de plano anestésico, a fim de se provocar a

overdose barbitúrica e consequente óbito. Seria utilizada via intraperitoneal – IP em ratos e pela via intravenosa – IV em coelhos, cujo volume utilizado para tal procedimento seria calculado levando-se em consideração o seu peso corporal no momento da execução, e então seria considerado como óbito no grupo onde estivesse inserido.

#### 3.4.4 Avaliação Hematológica e Bioquímica

Finalizados os 14 dias de observações após a administração da molécula JME-173, foi realizada a coleta sanguínea para avaliação hematológica e bioquímica, a qual foi utilizado o protocolo anestésico com cetamina 100 mg/kg e xilazina 5 mg/kg, para ambas as espécies. O volume final utilizado para este procedimento foi calculado após a última avaliação do peso corporal de cada animal, a fim de se garantir a segurança e eficácia do ato anestésico, bem como priorizar o bem-estar dos animais. Os ratos receberam o protocolo anestésico pela via IP e os coelhos pela via IM.

Após a certificação de que o animal se encontrava no estágio desejável do plano anestésico, após perda dos reflexos interdigitais e ausência da movimentação caudal após pinçamento, a coleta sanguínea realizou-se através de punção cardíaca, com o animal em decúbito lateral esquerdo, guiando-se pelos espaços intercostais, entre o 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> e palpando-se a região do pré-córdio, conforme exemplifica a figura 08.

Figura 08: Punção cardíaca em Ratos Wistar.



Foto: Miguel Brück, 2015.

Nos ratos, foi realizada a punção utilizando-se seringa de 5 ml e agulha 25 x 0,7; e nos coelhos utilizou-se seringa de 20 ml e agulha 25 x 0,8. Para a avaliação hematológica o sangue coletado foi acondicionado em tubos com o anticoagulante EDTA, e para a avaliação bioquímica o sangue coletado foi acondicionado em tubos contendo ativador de coágulo.

As análises séricas foram realizadas através da utilização da Plataforma Tecnológica de Análises Clínicas do CECAL do Programa de Desenvolvimento e Insumos para a Saúde – PDTIS da Fiocruz, e pelo laboratório de análises clínicas veterinárias Laborlife LTDA®.

Os seguintes parâmetros foram analisados:

- Avaliação hematológica: hematócrito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, contagem eritrócitos, contagem de plaquetas, contagem total de leucócitos;
- Avaliação bioquímica: ácido úrico, enzima aspartato aminotransferase, enzima alanino aminotransferase, creatinina, proteínas totais colesterol total, fosfatase alcalina, fósforo, albumina, glicose, potássio, sódio e uréia,

### 3.4.5 Finalização Humanitária

Foi realizada logo após a coleta sanguínea, a finalização humanitária de cada animal, através da punção cardíaca total, e a certificação do óbito por hipovolemia em plano anestésico, certificando-se a cessação dos batimentos cardíacos com o auxílio de um estetoscópio cardíaco pediátrico. Assim evitou-se a adição de novas drogas que pudessem interferir na avaliação final do ensaio, bem como o uso de atmosfera enriquecida com gás anestésico, preservando as estruturas pulmonares, o que poderia acarretar em alterações dos parâmetros visuais do exame de anatomopatologia macroscópica.

### 3.4.6 Avaliação anatomopatológica e avaliação do peso dos órgãos

Foi realizado o exame anatomopatológico macroscópico de todos os animais dos grupos experimentais e controle, a fim de se coletar o maior número de informações sobre possíveis alterações funcionais dos órgãos, bem como sinais sistêmicos de toxicidade.

Após a certificação do óbito, o animal foi colocado em decúbito dorso-ventral, e feito o exame externo, a fim de se observar linfonodos subcutâneos externos, pele e pelos, cavidades e orifícios naturais, bem como a qualidade das mucosas.

Foi realizado o exame anatomopatológico macroscópico de todos os animais (grupos experimentais e controle), a fim de se coletar o maior número de informações sobre possíveis alterações funcionais dos órgãos, bem como sinais sistêmicos de toxicidade.

Cada animal foi posicionado em decúbito dorso-ventral, e feito incisão mentopubiana superficial. Seguiu-se dissecando a pele e subcutâneo de todo tórax, região cervical ventral e abdome com o auxílio de um bisturi com lamina Nº 21, a fim de expor os linfonodos dessas regiões. Com o auxílio de uma tesoura cirúrgica curva ponta romba fez-se a desarticulação dos membros anteriores e posteriores de maneira que ocorra a exposição completa da pelve e tórax para melhor visualização.



Com o auxílio de um bisturi com lamina Nº 21, fez-se pequena incisão abdominal junto a cartilagem xifóide, seguindo pela linha alba até o púbis. Com auxílio de um costótomo, desarticulou-se a região costochondral em todos os pontos de fixação das costelas, bem como seccionou-se os ramos cranial e caudal do púbis, permitindo a visualização dos órgãos “*in situ*” nas cavidades torácica, abdominal e pélvica; e em seguida os órgãos foram deslocados com o auxílio de uma pinça anatômica, a fim de melhor visualização de acordo com suas posições topográficas. Em sequência, cada órgão, víscera e linfonodo foram retirados para melhor avaliação, e posterior pesagem e ressecção quando necessário.

Foram selecionados para pesagem isolada, os seguintes órgãos e registrados em tabela para avaliação do peso absoluto e relativo: baço, fígado, pâncreas, rim direito, rim esquerdo, linfonodo mesentérico, pulmão, coração e timo.

O peso absoluto foi registrado a partir da pesagem direta de cada órgão selecionado, e o peso relativo foi obtido através do cálculo do peso absoluto do órgão dividido pelo peso vivo do animal dividido por cem, de acordo com a fórmula:  $\text{Peso relativo do órgão} = (\text{peso absoluto do órgão} / \text{peso vivo do animal}) \times 100$ .

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste Kolmogorov-Smirnov; e para essa avaliação, um p valor maior que 0,1 indica que os dados se distribuem normalmente.

Caso as distribuições não possuam características de normalidade, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (para três ou mais amostras). Quando os dados analisados se distribuíam normalmente, utilizou-se então o teste de Levene para a homocedasticidade, onde as variâncias foram consideradas normais quando o p valor foi maior que 0,05.

Sendo as variâncias iguais, utilizou-se uma ANOVA global para verificar se haviam diferenças entre os grupos. Onde estas foram observadas, procedeu-se com uma ANOVA de menor ordem juntamente com o teste de Bonferroni para comparações múltiplas, ou o teste de Tamhane quando as variâncias foram

diferentes. Foram considerados como tendo significância estatística quando valores de p se apresentavam menores que 0,05

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SPSS 20.0 para Mac.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS

Na avaliação dos sinais clínicos em ratos Wistar, não houve nenhuma anotação de alterações nos padrões estabelecidos para esta avaliação, e não foi necessária a realização da finalização humanitária, cujo animal seria considerado óbito, conforme os critérios estabelecidos no item 3.4.3. O resultado encontra-se apresentado na Tabela 01, e não houve a ocorrência de óbitos durante os 14 dias de observação.

Tabela 01: Resultado da Avaliação dos Sinais Clínicos, em ratos Wistar 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.

	JME 173 (n=5)				
	Controle	5 mg/kg	50 mg/kg	300 mg/kg	2000 mg/kg
<b>Machos</b>	Sem alterações. Sem óbitos.	Sem alterações. Sem óbitos.	Sem alterações. Sem óbitos.	Sem alterações. Sem óbitos.	Sem alterações. Sem óbitos.
<b>Fêmeas</b>	Sem alterações. Sem óbitos.	Sem alterações. Sem óbitos.	Sem alterações. Sem óbitos.	Sem alterações. Sem óbitos.	Sem alterações. Sem óbitos.

A avaliação dos sinais clínicos na espécie de coelhos Nova Zelândia albino, comportou-se da mesma forma que a espécie rato Wistar, ou seja, não houve nenhuma anotação de alterações nos padrões estabelecidos para esta avaliação e não foi necessária a realização da finalização humanitária, conforme os critérios estabelecidos no item 3.4.3. O resultado encontra-se na Tabela 02, e da mesma forma que a avaliação da espécie de rato Wistar não houve a ocorrência de óbitos durante os 14 dias de observação.

Tabela 02: Resultado da Avaliação dos Sinais Clínicos, em coelhos Nova Zelândia albino, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.

		<b>JME 173 (n=5)</b>				
		<b>Controle</b>	<b>5 mg/kg</b>	<b>50 mg/kg</b>	<b>300 mg/kg</b>	<b>2000 mg/kg</b>
<b>Machos</b>	Sem	Sem	Sem	Sem	Sem	Sem
	alterações.	alterações.	alterações.	alterações.	alterações.	alterações.
	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.
<b>Fêmeas</b>	Sem	Sem	Sem	Sem	Sem	Sem
	alterações.	alterações.	alterações.	alterações.	alterações.	alterações.
	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO FINAL

O cálculo do ganho de peso final foi obtido através do somatório das diferenças entre o peso inicial e os dias 01, 03, 07 e 14, da seguinte forma:

$$\text{Ganho de Peso Final (g)} = \sum (\text{Peso}_{D1} - \text{Peso}_{\text{inicial}}) + (\text{Peso}_{D3} - \text{Peso}_{D1}) + (\text{Peso}_{D7} - \text{Peso}_{D3}) + (\text{Peso}_{D14} - \text{Peso}_{D7}).$$

Esses valores foram expressos em média e desvio padrão da média de cada grupo experimental e o grupo controle.

Na avaliação do ganho de peso final da espécie rato Wistar, todos os animais dos grupos experimentais e do grupo controle ganharam peso conforme os padrões fisiológicos para a espécie, e estão apresentados na tabela 03. Não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no ganho de peso dos animais dos grupos experimentais e em relação aos dos grupos controle

Tabela 03: Avaliação do Ganho de Peso Final (g) em ratos Wistar, 14 dias após a administração oral em dose única de JME 173.

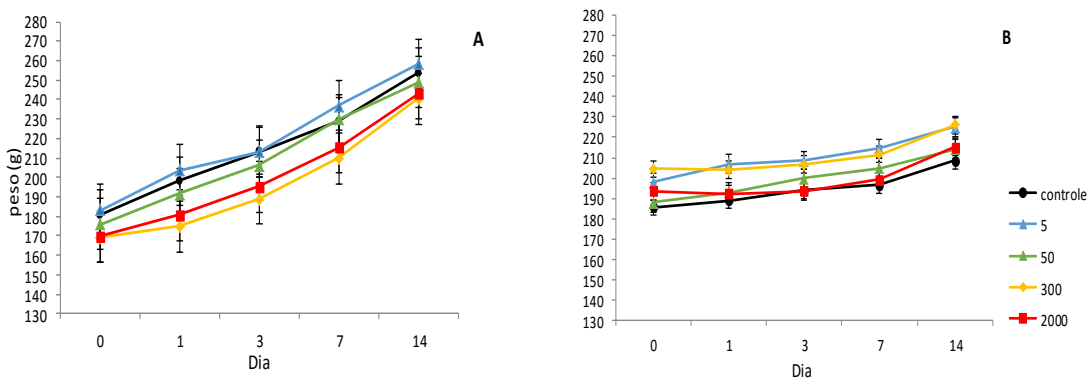
	JME 173 (n=5)				
	Controle	5 mg/kg	50 mg/kg	300 mg/kg	2000 mg/kg
<b>Machos</b> Peso (g)	73,02 ± 10,43	74,82 ± 8,83	72,9 ± 8,21	71,4 ± 7,78	73,44 ± 3,58
<b>Fêmeas</b> Peso (g)	23 ± 4,4	27,25 ± 7,3	26,5 ± 3,2	21,6 ± 2,6	21,6 ± 3,3

Os dados foram expressos em Média ± Erro padrão da média (n=5 por grupos).

\*Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05).

Também não foi observada diferença significativa (p < 0,05) no ganho de peso dos animais dos grupos experimentais e em relação aos dos grupos controle, na avaliação dos dias 01, 03, 07 e 14, em ambas as espécies avaliadas, conforme ilustra o gráfico 01.

Gráfico 01: Média de Peso (g) nos dias 0, 1, 3, 7 e 14, após a administração oral em dose única de JME-173, em ratos Wistar. Machos (A) e Fêmeas (B).



O cálculo para o ganho de peso final da espécie coelhos Nova Zelândia albino foi obtido da mesma forma que para a espécie rato Wistar, através do somatório das diferenças entre o peso inicial e os dias 01, 03, 07 e 14, conforme exemplificado anteriormente.

E da mesma forma, no ganho de peso final da espécie coelhos Nova Zelândia albino, os animais dos grupos experimentais e do grupo controle ganharam peso conforme os padrões fisiológicos da sua espécie. Os valores são apresentados na tabela 04 e também foram expressos em média e desvio padrão da média. Também não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no ganho de peso dos animais dos grupos experimentais e em relação aos dos grupos controle

Tabela 04: Avaliação do Ganho de Peso Final (g) em coelhos Nova Zelândia albino, 14 dias após a administração oral em dose única de JME 173.

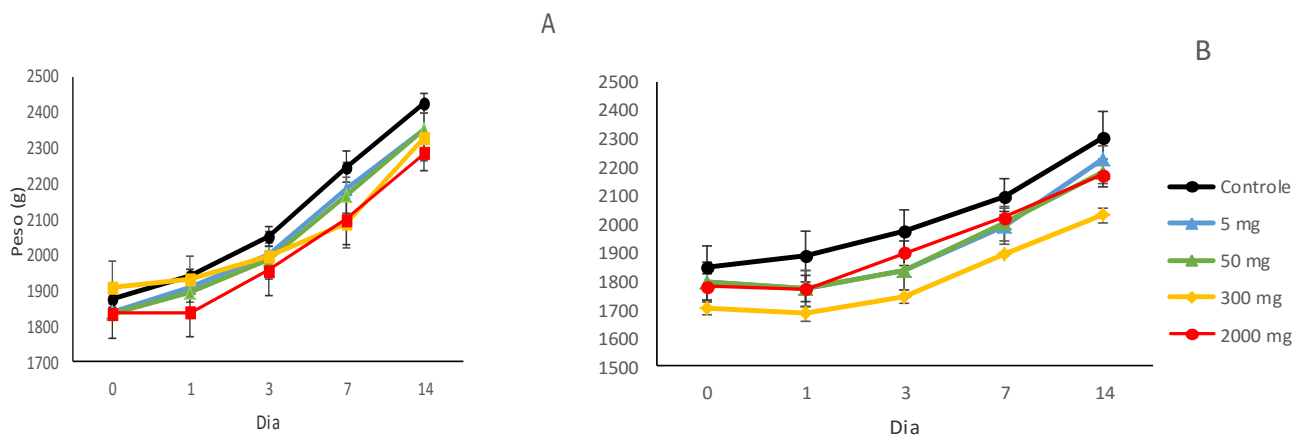
	JME 173(n=5)				
	Controle	5 mg/kg	50 mg/kg	300 mg/kg	2000 mg/kg
<b>Machos</b>					
Peso (g)	550,78 ± 71,58	513,12 ± 121,77	518,88 ± 123,04	420,12 ± 74,04	451,12 ± 119,84
<b>Fêmeas</b>					
Peso (g)	394,92 ± 76,32	381,76 ± 43,224	413,94 ± 35,05	330,84 ± 75,11	487,18 ± 90,55

Os dados foram expressos em Média ± Erro padrão da média (n=5 por grupos).

\*Diferença estatística significativa do grupo controle ( $p > 0,05$ ).

Da mesma forma, não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no ganho de peso dos animais dos grupos experimentais e em relação aos dos grupos controle, na avaliação dos dias 01, 03, 07 e 14, ilustra o gráfico 02.

Gráfico 02: Média de Peso (g) nos dias 0, 1, 3, 7 e 14, após a administração oral em dose única de JME-173, em coelhos Nova Zelândia albino. Machos (A) e Fêmeas (B).



### 4.3 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR

Para a avaliação da ingestão alimentar, os valores foram obtidos a partir do somatório das pesagens individuais da ração consumida por cada animal no período, e foram expressos em média e desvio padrão da média, da seguinte forma:

$$\text{Soma da Ingestão Alimentar (g)} = \sum \text{Consumo}_{D1} + \text{Consumo}_{D3} + \text{Consumo}_{D7} + \text{Consumo}_{D14}$$

Na avaliação da ingestão alimentar da espécie ratos Wistar, todos os animais dos grupos experimentais e do grupo controle ingeriram o alimento ofertado conforme os padrões fisiológicos de cada espécie avaliada e estão apresentados na tabela 05.

Não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os animais dos grupos experimentais e em relação aos dos grupos controle.

Tabela 05: Avaliação da Soma da Ingestão Alimentar (g) por indivíduo, em ratos Wistar, durante 14 dias após a administração oral em dose única de JME 173.

	JME 173 (n=5)				
	Controle	5 mg/kg	50 mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
<b>Machos</b> Peso (g)	20,99 ± 0,22	20,02 ± 0,50	19,95 ± 0,19	19,07 ± 0,13	19,06 ± 1,17
<b>Fêmeas</b> Peso (g)	16,60 ± 0,78	18,11 ± 1,86	18,08 ± 0,95	17,34 ± 0,74	16,23 ± 0,91

Os dados foram expressos em Média ± Erro padrão da média (n=5 por grupo).

\*Diferença estatística significativa do grupo controle ( $p > 0,05$ ).

Os valores da soma da ingestão alimentar por indivíduo da espécie coelho Nova Zelândia albino são apresentados na tabela 06 e estão expressos em média e desvio padrão da média. Não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os animais dos grupos experimentais e em relação aos dos grupos controle.

Tabela 06: Avaliação da Soma da Ingestão Alimentar (g) por indivíduo, em coelhos Nova Zelândia albino, durante 14 dias após a administração oral em dose única de JME 173.

	JME 173 (n=5)				
	Controle	5 mg/kg	50 mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
<b>Macho</b> Peso (g)	1238,24 ± 18,20	1219,56 ± 27,97	1220,38 ± 27,55	1207,66 ± 13,02	1208,7 ± 25,40
<b>Fêmea</b> Peso (g)	1137,64 ± 8,36	1086,86 ± 15,68	1112,54 ± 42,73	1111,42 ± 19,61	1109,44 ± 18,96

Os dados foram expressos em Média ± Erro padrão da média (n=5 por grupo).  
\*Diferença estatística significativa do grupo controle ( $p > 0,05$ ).

#### 4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Na avaliação dos parâmetros hematológicos na espécie ratos Wistar, foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle, no parâmetro hematócrito no grupo de fêmeas, de acordo com o teste de Bonferroni cujos valores foram de 43,34% ± 0,33 para a dose 5 mg/kg ( $p = 0,046$ ); 42,04% ± 0,33 para a dose de 50 mg/kg ( $p = 0,011$ ) e 42,46% ± 0,94 para a dose de 2000 mg/kg ( $p = 0,005$ ), quando o grupo controle apresentou valor de 46,18% ± 0,52, havendo então uma diminuição estatisticamente significativa, porém dentro da faixa de variação informada pelos valores de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi avaliado, cujo valor foi de 40,2 a 54,6%.

Nos demais parâmetros, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos experimentais, de acordo com a tabela 07.



Tabela 07: Avaliação hematológica de ratos Wistar, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.

	Valores Referenciais	JME 173 (n=5)				
		Controle	5 mg/Kg	50 mg/Kg	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
<b>Machos</b>						
Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> )	8,2 a 8,8	7,51 ± 0,09	7,83 ± 0,07	7,83 ± 0,15	7,71 ± 0,24	7,36 ± 0,12
HGB (g/dL)	8,0 a 9,0	15,46 ± 0,28	16,10 ± 0,34	16,02 ± 0,18	15,86 ± 0,61	15,18 ± 0,33
Hct (%)	40,2 a 54,6	47,00 ± 0,65	48,42 ± 0,79	48,38 ± 0,51	47,42 ± 0,95	46,98 ± 0,98
VCM (fm <sup>3</sup> )	55,6 a 59,4	62,52 ± 0,53	49,86 ± 12,08	61,82 ± 0,73	63,50 ± 0,44	63,84 ± 0,62
HCM (pg)	18,1 a 19,9	20,68 ± 0,36	20,58 ± 0,32	20,48 ± 0,17	20,66 ± 0,22	20,62 ± 0,14
HCMC (g/dL)	32,7 a 33,9	32,86 ± 0,35	33,26 ± 0,25	33,10 ± 0,17	32,64 ± 0,37	32,34 ± 0,36
Leuco (mil/mm <sup>3</sup> )	4,1 a 9,3	5,98 ± 0,89	7,52 ± 0,50	7,20 ± 0,66	7,96 ± 0,62	5,94 ± 0,59
Plaq (mil/mm <sup>3</sup> )	409,6 a 793,6	909,40 ± 55,77	980,60 ± 71,60	961,80 ± 57,06	816,00 ± 36,37	987,20 ± 40,97
<b>Fêmeas</b>						
Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> )	8,2 a 8,8	7,91 ± 0,50	7,59 ± 0,05	7,33 ± 0,08	7,77 ± 0,06	7,33 ± 0,13
HGB (g/dL)	8,0 a 9,0	15,78 ± 0,29	14,84 ± 0,09	14,52 ± 0,35	15,18 ± 0,07	14,68 ± 0,21
Hct (%)	40,2 a 54,6	46,18 ± 0,52	<b>43,34 ± 0,33*</b>	<b>42,04 ± 0,33*</b>	44,68 ± 0,54	<b>42,46 ± 0,94*</b>
VCM (fm <sup>3</sup> )	55,6 a 59,4	57,62 ± 0,37	57,34 ± 0,32	57,24 ± 0,56	58,30 ± 0,45	58,20 ± 0,45
HCM (pg)	18,1 a 19,9	19,92 ± 0,49	19,48 ± 0,11	20,00 ± 0,51	19,86 ± 0,37	20,22 ± 0,55
HCMC (g/dL)	32,7 a 33,9	35,06 ± 0,22	34,14 ± 0,53	34,78 ± 0,41	34,32 ± 0,58	34,48 ± 0,38
Leuco (mil/mm <sup>3</sup> )	4,1 a 9,3	4,04 ± 0,43	5,16 ± 0,50	6,07 ± 0,71	5,50 ± 0,55	5,22 ± 1,61
Plaq (mil/mm <sup>3</sup> )	409,6 a 793,6	890,80 ± 58,31	927,40 ± 21,54	881,00 ± 57,04	838,60 ± 117,97	454,40 ± 128,43

HGB, Hemoglobina; Hct, Hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; HCMC, concentração de hemoglobina corpuscular média; Leuco, Leucócitos Totais; Plaq, Plaquetas.  
Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=5 por grupo experimental)  
\*Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05).

Na avaliação dos parâmetros hematológicos na espécie coelhos Nova Zelândia, foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle, nos seguintes parâmetros:

→Hematócrito: no grupo de fêmeas o grupo controle apresentou valores de  $39,44\% \pm 1,44$  e de acordo com o teste Bonferroni, houve aumento estatisticamente significativo nas doses de 5 mg/kg ( $p = 0,001$ ) com valores de  $42,24\% \pm 2,97$  e na dose de 50 mg/kg ( $p = 0,007$ ); com valores de  $40,62\% \pm 1,25$ . Esses valores foram maiores do que os informados nos valores de referência fornecidos pelo laboratório onde foi analisado, que variou entre 26,4 e 37,2%. Já no grupo de machos, o grupo controle apresentou valores de  $32,80\% \pm 0,83$  e houve aumento estatisticamente significativo na dose 5 mg/kg ( $p = 0,014$ ) com valores de  $33,02\% \pm 0,74$ ; na dose de 300 mg/kg ( $p = 0,037$ ) com valores de  $36,66\% \pm 0,32$  e nas doses de 2000 mg/kg ( $p = 0,006$ ) com valores de  $37,06\% \pm 0,65$ . O valor de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi analisado que variou entre 31,1 e 36,1%; e todos os valores dos grupos experimentais e controle se encontravam dentro dessa faixa de variação informada pelos valores de referência fornecidos pelo laboratório onde o material foi avaliado.

→VCM: no grupo de fêmeas, o grupo controle apresentou valores de  $71,46 \pm 0,38$  fm<sup>3</sup> estando acima dos valores de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi analisado que variou entre 58,5 a 62,7 fm<sup>3</sup>; e de acordo com o teste de Tamhane houve diminuição estatisticamente significativa na dose de 5 mg/kg ( $p = 0,007$ ) com valores de  $71,06$  fm<sup>3</sup>  $\pm 0,63$ , na dose de 50 mg/kg ( $p = 0,022$ ) com valores de  $71,88$  fm<sup>3</sup>  $\pm 1,23$ , na dose de 300 mg/kg ( $p = 0,001$ ) com valores  $68,84$  fm<sup>3</sup>  $\pm 0,92$ ; e na dose de 2000 mg/kg ( $p = 0,002$ ) com valores de  $69,56$  fm<sup>3</sup>  $\pm 0,58$ . Todos os valores dos grupos experimentais e controle se encontravam acima da faixa de variação informada pelos valores de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi avaliado. Já no grupo dos machos, o grupo controle apresentou valores de  $60,26$  fm<sup>3</sup>  $\pm 0,70$  e houve diminuição estatisticamente significativa na dose de 5 mg/kg ( $p = 0$ ) com valores de  $57,42$  fm<sup>3</sup>  $\pm 1,65$ ; já na dose 50 mg/kg ( $p = 0$ ) houve aumento estatisticamente significativo com valores de  $61,96$  fm<sup>3</sup>  $\pm 1,48$ , bem como na dose de 300 mg/kg ( $p = 0$ ) com valores de  $62,07$  fm<sup>3</sup>  $\pm 0,88$  e também na dose de 2000 mg/kg ( $p = 0$ ) com valores de  $63,36$  fm<sup>3</sup>  $\pm 0,85$ . O valor de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi analisado variou entre 53,2 e 66,4 fm<sup>3</sup> e todos os valores dos grupos experimentais e controle se encontravam

dentro dessa faixa de variação fornecida pelo laboratório onde o material foi avaliado.

→HCM: no grupo de fêmeas o grupo controle variou em  $20,78 \text{ pg} \pm 0,31$ , e de acordo com o teste de Tamhane, houve diminuição estatisticamente significativa na dose de  $5 \text{ mg/kg}$  ( $p=0,005$ ) cujo valor foi de  $20,54 \text{ pg} \pm 0,23$ ; porém o mesmo estava dentro da faixa de variação informada pelos valores de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi avaliado, que variou entre  $17,7$  a  $21,9 \text{ pg}$ . Já no grupo de machos o grupo controle apresentou valores de  $19,18 \text{ pg} \pm 0,25$ ; e de acordo com o teste de Bonferroni houve aumento estatisticamente significativo na dose de  $50 \text{ mg/kg}$  ( $p = 0,002$ ) cujo valor foi de  $19,70 \text{ pg} \pm 0,58$ , e na dose de  $300 \text{ mg/kg}$  ( $p = 0,017$ ) com valor de  $19,39 \text{ pg} \pm 0,28$ ; porém estes valores estavam dentro da faixa de variação informada pelos valores de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi avaliado, que variou entre  $17,9$  a  $21,9 \text{ pg}$ .

→HCMC: no grupo de fêmeas o grupo controle apresentou valor de  $29,22 \text{ g/dL} \pm 0,30$  e de acordo com o teste de Bonferroni houve aumento estatisticamente significativo na dose de  $5 \text{ mg/kg}$  ( $p = 0$ ) cujo valor foi de  $28,94 \text{ g/dL} \pm 0,24$ . Já na dose de  $50 \text{ mg/kg}$  ( $p = 0$ ) com valores de  $29,54 \text{ g/dL} \pm 0,47$ , na dose de  $300 \text{ mg/kg}$  ( $p = 0,001$ ) com valores de  $30,34 \text{ g/dL} \pm 0,19$  e na dose de  $2000 \text{ mg/kg}$  ( $p = 0,001$ ) com valores de  $29,28 \text{ g/dL} \pm 0,24$  houve aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle; porém esses valores estavam dentro da faixa de variação informada pelos valores de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi avaliado cujo valor variou entre  $30,1$  a  $33,6 \text{ g/dL}$ . No grupo de machos o grupo controle apresentou valores de  $31,82 \text{ g/dL} \pm 0,23$  e de acordo com o teste de Bonferroni, houve diminuição estatisticamente significativa na dose de  $5 \text{ mg/kg}$  ( $p = 0$ ) com valores de  $32,03 \text{ g/dL} \pm 0,44$ ; na dose de  $50 \text{ mg/kg}$  ( $p = 0$ ) com valores de  $31,77 \text{ g/dL} \pm 0,21$ ; na dose de  $300 \text{ mg/kg}$  ( $p = 0,019$ ) com valores de  $31,09 \text{ g/dL} \pm 0,16$  e  $2000 \text{ mg/kg}$  ( $p = 0$ ) com valores de  $31,25 \text{ g/dL} \pm 0,18$ ; porém estes valores estavam dentro da faixa de variação informada pelos valores de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi avaliado, que variou entre  $30,2$  a  $33,8 \text{ g/dL}$ .

→Leucócitos: no grupo de fêmeas o grupo controle variou em  $3,50 \text{ mil/mm}^3 \pm 0,27$ , e de acordo com o teste de Bonferroni, houve aumento estatisticamente significativo na dose de  $5 \text{ mg/kg}$  ( $p = 0,013$ ) com valores de  $5,10 \text{ mil/mm}^3 \pm 0,05$ , sendo que este valor se encontrava acima da faixa de variação informada pelos valores de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi avaliado, e cujo valor foi de

2,4 a 4,6 mil/mm<sup>3</sup>. Já no grupo de machos não foi observado diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos experimentais, de acordo com o teste de Tamhane, porém a dose de 2000 mg/kg encontrava-se abaixo dos valores de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi avaliado, cujo valor foi de  $2,79 \pm 0,21$  mil/mm<sup>3</sup>.

→Plaquetas: no grupo de machos o grupo controle apresentou valores de  $330,60$  mil/mm<sup>3</sup>  $\pm 24,35$ , e de acordo com o teste de Bonferroni houve diminuição estatisticamente significativa na dose de 300 mg/kg ( $p = 0,006$ ) com valores de  $244,00$  mil/mm<sup>3</sup>  $\pm 39,45$  e na dose de 2000 mg/kg ( $p = 0,026$ ) com valores de  $180,20$  mil/mm<sup>3</sup>  $\pm 22,85$ . Porém todos os grupos experimentais e o grupo controle se encontravam dentro da faixa de variação dos valores de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi avaliado, com valores de 107 a 591 mil/mm<sup>3</sup>. No grupo de fêmeas o grupo controle apresentou valores de  $463,40$  mil/mm<sup>3</sup>  $\pm 34,60$ , e houve aumento estatisticamente significativo, de acordo com o teste de Bonferroni, na dose de 5 mg/kg ( $p = 0,003$ ) com valores de  $507,20$  mil/mm<sup>3</sup>  $\pm 87,39$ ; na dose de 300 mg/kg ( $p = 0,001$ ) com valores de  $612,40$  mil/mm<sup>3</sup>  $\pm 39,48$ ; e na dose de 2000 mg/kg ( $p = 0$ ) com valores de  $464,80$  mil/mm<sup>3</sup>  $\pm 13,32$ ; já na dose de 50 mg/kg ( $p = 0$ ) houve diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo controle apresentando valores de  $415,00$  mil/mm<sup>3</sup>  $\pm 31,83$ , e apenas a dose de 300 mg/kg se encontrava acima da faixa de variação informada pelos valores de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi avaliado, que apresentou valores 157 a 631 mil/mm<sup>3</sup>

Nos demais parâmetros, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos experimentais, de acordo com a tabela 08.

Tabela 08: Avaliação hematológica de coelhos Nova Zelândia albino, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.

	Valores Referenciais	JME 173 (n=5)				
		Controle	5 mg/Kg	50 mg/Kg	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
<b>Machos</b>						
Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> )	3,4 a 7,2	5,45 ± 0,19	5,58 ± 0,21	5,52 ± 0,27	5,91 ± 0,04	5,87 ± 0,18
HGB (g/dL)	8,8 a 9,8	10,44 ± 0,27	10,58 ± 0,36	10,82 ± 0,36	11,40 ± 0,11	11,58 ± 0,17
Hct (%)	31,1 a 36,1	32,80 ± 0,83	<b>33,02 ± 0,74*</b>	34,06 ± 1,16	<b>36,66 ± 0,32*</b>	<b>37,06 ± 0,65*</b>
VCM (fm <sup>3</sup> )	53,2 a 66,4	60,26 ± 0,70	<b>57,42 ± 1,65*</b>	<b>61,96 ± 1,48*</b>	<b>62,07 ± 0,88*</b>	<b>63,36 ± 0,85*</b>
HCM (pg)	17,9 a 21,9	19,18 ± 0,25	18,35 ± 0,31	<b>19,70 ± 0,58*</b>	<b>19,39 ± 0,28*</b>	19,76 ± 0,41
HCMC (g/dL)	30,2 a 33,8	31,82 ± 0,23	<b>32,03 ± 0,44*</b>	<b>31,77 ± 0,21*</b>	<b>31,09 ± 0,16*</b>	<b>31,25 ± 0,18*</b>
Leuco (mil/mm <sup>3</sup> )	3,2 a 7,2	4,72 ± 0,24	5,58 ± 0,55	4,90 ± 0,38	3,83 ± 0,46	2,79 ± 0,21
Plaq (mil/mm <sup>3</sup> )	107 a 591	330,60 ± 24,35	271,40 ± 34,66	232,80 ± 19,31	<b>244,00 ± 39,45*</b>	<b>180,20 ± 22,85*</b>
<b>Fêmeas</b>						
Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> )	2,4 a 4,6	5,04 ± 0,40	5,94 ± 0,40	5,63 ± 0,24	5,99 ± 0,24	6,15 ± 0,20
HGB (g/dL)	9,8 a 11,8	11,54 ± 0,33	12,20 ± 0,75	11,90 ± 0,24	12,50 ± 0,54	12,62 ± 0,47
Hct (%)	26,4 a 37,2	39,44 ± 1,44	<b>42,24 ± 2,97*</b>	<b>40,62 ± 1,25*</b>	41,18 ± 1,63	43,12 ± 1,61
VCM (fm <sup>3</sup> )	58,5 a 62,7	71,46 ± 0,38	<b>71,06 ± 0,63*</b>	<b>71,88 ± 1,23*</b>	<b>68,84 ± 0,92*</b>	<b>69,56 ± 0,58*</b>
HCM (pg)	17,7 a 21,9	20,78 ± 0,31	<b>20,54 ± 0,23*</b>	21,30 ± 0,47	20,90 ± 0,39	20,38 ± 0,09
HCMC (g/dL)	30,1 a 33,6	29,22 ± 0,30	<b>28,94 ± 0,24*</b>	29,54 ± 0,47	<b>30,34 ± 0,19*</b>	<b>29,28 ± 0,24*</b>
Leuco (mil/mm <sup>3</sup> )	2,4 a 4,6	3,50 ± 0,27	<b>5,10 ± 0,05*</b>	4,32 ± 0,27	5,58 ± 0,48	3,96 ± 0,39
Plaq (mil/mm <sup>3</sup> )	157 a 631	463,40 ± 34,60	<b>507,20 ± 87,39*</b>	<b>415,00 ± 31,83*</b>	<b>612,40 ± 39,48*</b>	<b>464,80 ± 13,32*</b>

HGB, Hemoglobina; Hct, Hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; HCMC, concentração de hemoglobina corpuscular média; Leuco, Leucócitos Totais; Plaq, Plaquetas.  
 Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=5 por grupo experimental)  
 \*Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS:

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos na espécie ratos Wistar, foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle, nos seguintes parâmetros, apresentados nas tabelas 09 e 10:

→Sódio: no grupo de fêmeas, o grupo controle apresentou valores de 138,60 mEq/L  $\pm$  0,81; e de acordo com o teste de Bonferroni houve aumento estatisticamente significativo na dose de 300 mg/kg ( $p = 0,02$ ) com valores de 143,00 mEq/L  $\pm$  0,77 e na dose de 2000 mg/kg ( $p = 0,047$ ) com valores de 142,60 mEq/L  $\pm$  0,98., porém estes valores se encontravam dentro da faixa de variação informada pelos valores de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi avaliado, cujo valor foi entre 135 e 146 mEq/L. Já no grupo dos machos o grupo controle apresentou valores de 146,60 mEq/L  $\pm$  1,63 e segundo o teste de Bonferroni, somente a dose de grupo 300 mg/kg teve aumento estatisticamente significativo, com  $p = 0,002$ ; e valores de 155 mEq/L  $\pm$  1,41, que se encontra acima da faixa de variação informada pelos valores de referência fornecido pelo laboratório onde o material foi avaliado, cujo valor variou entre 135 a 146 mEq/L.

→Glicose: no grupo dos machos o grupo controle apresentou valores de 183,40 mg/dL  $\pm$  17,36 e acordo como teste de Bonferroni, na dose de 300 mg/kg, houve aumento estatisticamente significativo, com  $p = 0,031$  e valores de 255,00 mg/dL  $\pm$  14,20; estando acima da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, cujo valores variou entre 50 a 135 mg/dL. Contudo todos os grupos se encontravam acima da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, com valores de 190,20 mg/dL  $\pm$  16,26; 194,40 mg/dL  $\pm$  14,01 e 242,20 mg/dL  $\pm$  13,08 para as doses de 5, 50 e 2000 mg/kg respectivamente.

→Colesterol: no grupo dos machos o grupo controle apresentou valores de 70,40 mg/dL  $\pm$  2,18; e de acordo com o teste de Tamhane, somente no grupo de machos, na dose de 2000 mg/kg houve aumento estatisticamente significativo, com  $p = 0,007$  e valores de 87,40 mg/dL  $\pm$  2,34, estando este valor dentro da faixa de variação informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, cujo valor foi entre 20 a 92 mg/dL; assim como as demais. Nos demais parâmetros, não foram observadas

diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos experimentais.

Tabela 09: Avaliação bioquímica sérica de ratos Wistar machos, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.

	Valores Referenciais	JME 173 (n=5)				
		Controle	5 mg/Kg	50 mg/Kg	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
<b>Machos</b>						
Na (mEq/L)	135 a 146	146,60 ± 1,63	149,80 ± 0,49	149,40 ± 0,81	<b>155,00 ± 1,41*</b>	150,00 ± 1,70
K (mEq/L)	4 a 5,9	5,38 ± 0,24	4,64 ± 0,16	5,14 ± 0,13	6,28 ± 0,44	6,22 ± 0,45
Glicose (mg/dL)	50 a 135	183,40 ± 17,36	190,20 ± 16,26	194,40 ± 14,01	<b>255,00 ± 14,20*</b>	242,20 ± 13,08
Uréia (mg/dL)	9 a 31	47,70 ± 4,05	49,46 ± 1,28	49,92 ± 3,33	50,46 ± 2,42	55,50 ± 1,03
Creatinina (mg/dL)	0,05 a 0,65	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,20 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,20 ± 0,00
Ácido Úrico (mg/dL)	0,8 a 4,4	1,62 ± 0,52	1,34 ± 0,44	0,82 ± 0,19	1,08 ± 0,10	0,96 ± 0,11
Albumina (g/dL)	3,8 a 4,8	3,02 ± 0,14	3,06 ± 0,05	3,10 ± 0,05	2,94 ± 0,05	3,20 ± 0,04
P (mg/dL)	5,8 a 11,2	8,98 ± 0,51	8,30 ± 0,15	8,92 ± 0,24	11,70 ± 0,62	10,26 ± 0,71
AST (U/L)	39 a 111	72,00 ± 6,39	66,20 ± 0,80	75,20 ± 0,05	115,00 ± 12,08	101,20 ± 13,29
ALT (U/L)	20 a 61	45,20 ± 2,40	50,20 ± 0,37	46,20 ± 3,76	58,20 ± 4,50	60,00 ± 5,20
FA (U/L)	16 a 302	223,40 ± 3,71	268,00 ± 15,44	220,20 ± 15,16	219,40 ± 11,19	209,00 ± 3,03
Colesterol (mg/dL)	20 a 92	70,40 ± 2,18	71,80 ± 2,82	77,20 ± 0,86	78,40 ± 5,01	<b>87,40 ± 2,34*</b>
PTN total (g/dL)	5,3 a 6,9	4,86 ± 0,20	5,00 ± 0,05	5,10 ± 0,10	4,86 ± 0,07	5,20 ± 0,11

Na, Sódio; K, Potássio; P, Fósforo; AST, Aspartato Aminotransferase; ALT, Alanina Aminotransferase; FA, Fosfatase Alcalina; PTN tot, Proteínas totais.  
 Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=5 por grupo experimental).  
 \*Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05).



Tabela 10: Avaliação bioquímica sérica de ratos Wistar fêmeas, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.

	Valores Referenciais	JME 173 (n=5)				
		Controle	5 mg/Kg	50 mg/Kg	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
<b>Fêmeas</b>						
Na (mEq/L)	135 a 146	138,60 ± 0,81	142,00 ± 0,95	142,4 ± 0,40	<b>143,00 ± 0,77*</b>	<b>142,60 ± 0,98*</b>
K (mEq/L)	4 a 5,9	4,46 ± 0,35	4,16 ± 0,27	4,76 ± 0,19	4,47 ± 0,36	5,7 ± 0,28
Glicose (mg/dL)	50 a 135	188,00 ± 29,29	201,40 ± 11,40	172,40 ± 12,57	170,20 ± 7,86	150,80 ± 9,19
Uréia (mg/dL)	9 a 31	47,68 ± 2,86	49,58 ± 1,06	55,14 ± 1,80	47,14 ± 3,79	53,82 ± 4,58
Creatinina (mg/dL)	0,05 a 0,65	0,30 ± 0,00	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,02
Ácido Úrico (mg/dL)	0,8 a 4,4	1,54 ± 0,62	1,32 ± 0,42	1,26 ± 0,27	1,28 ± 0,27	1,32 ± 0,15
Albumina (g/dL)	3,8 a 4,8	2,72 ± 0,20	2,82 ± 0,16	2,42 ± 0,22	2,92 ± 0,13	2,90 ± 0,11
P (mg/dL)	5,8 a 11,2	6,64 ± 0,62	6,42 ± 0,73	8,08 ± 0,51	7,58 ± 0,42	7,82 ± 0,23
AST (U/L)	39 a 111	97,80 ± 0,73	126,40 ± 41,11	113,80 ± 20,51	123,80 ± 15,18	177,00 ± 41,49
ALT (U/L)	20 a 61	59,20 ± 18,33	38,80 ± 6,86	34,00 ± 5,78	33,00 ± 2,90	27,20 ± 5,60
FA (U/L)	16 a 302	116,80 ± 30,55	80,00 ± 23,77	100,60 ± 30,45	105,00 ± 8,50	86,00 ± 11,21
Colesterol (mg/dL)	20 a 92	64,40 ± 3,88	66,60 ± 2,29	56,60 ± 5,28	72,00 ± 2,70	63,20 ± 5,77
PTN total (g/dL)	5,3 a 6,9	5,42 ± 0,24	6,14 ± 0,16	5,20 ± 0,51	6,00 ± 0,22	6,06 ± 0,33

Na, Sódio; K, Potássio; P, Fósforo; AST, Aspartato Aminotransferase; ALT, Alanina Aminotransferase; FA, Fosfatase Alcalina; PTN tot, Proteínas totais.  
Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=5 por grupo experimental).  
\*Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05).

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos na espécie coelhos Nova Zelândia albino, foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle, nos seguintes parâmetros apresentados nas tabelas 11 e 12:

→Potássio: no grupo de fêmeas o grupo controle apresentou valores de  $5,02 \pm 0,33$  mEq/L, e de acordo como teste de Bonferroni, houve diminuição estatisticamente significativa na dose de 5 mg/kg ( $p = 0,031$ ) com valores de  $4,86$  mEq/L  $\pm 0,18$ ; e na dose de 50 mg/kg ( $p = 0,027$ ) com valores de  $4,72$  mEq/L  $\pm 0,17$ ; e esses valores se encontravam dentro da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, que apresentou variação de 3,3 a 6,9 mEq/L. No grupo dos machos o grupo controle apresentou valores de  $3,68$  mEq/L  $\pm 0,12$ ; e de acordo com o teste de Tamhane, houve aumento estatisticamente significativo na dose 5 mg/kg ( $p = 0,01$ ) com valores de  $3,94$  mEq/L  $\pm 0,07$ ; e na dose de 50 mg/kg ( $p = 0,015$ ) com valores de  $3,92$  mEq/L  $\pm 0,16$ ; contudo esses valores também se encontram dentro da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado cuja variação foi de 3,3 a 6,9 mEq/L.

→Glicose: no grupo de machos o grupo controle apresentou valores de  $172,90$  mg/dL  $\pm 7,03$ , e de acordo com o teste de Bonferroni, foram encontrados aumentos estatisticamente significantes na dose 50 mg/kg ( $p = 0,015$ ) com valores de  $189,76$  mg/dL  $\pm 20,26$ ; e na dose de 2000 mg/kg ( $p = 0,022$ ) com valores de  $177,98$  mg/dL  $\pm 10,06$ , sendo esses que valores e o próprio valor do grupo controle já se encontravam acima da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, cuja variação foi de 75 a 145 mg/dL.

→Uréia: no grupo de fêmeas o grupo controle apresentou valores de  $30,70$  mg/dL  $\pm 3,38$ , e de acordo como teste de Bonferroni, houve aumento estatisticamente significativo na dose de 300 mg/kg ( $p = 0,024$ ) com valores de  $32,58$  mg/dL  $\pm 2,14$ ; e na dose de 2000 mg/kg ( $p = 0,015$ ) com valores de  $35,20$  mg/dL  $\pm 0,95$ , estando apenas a dose de 2000 mg/kg acima da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, que variou entre 10 e 34 mg/dL. No grupo dos machos o grupo controle apresentou valores de  $31,50$  mg/dL  $\pm 3,53$ ; e segundo o teste de Bonferroni, houve aumento estatisticamente significativo na dose de 300 mg/kg ( $p = 0,04$ ) com valores de  $46,06$  mg/dL  $\pm 3,17$ ; e na dose de 2000 mg/kg ( $p = 0,015$ ) com valores de  $46,96$  mg/dL  $\pm 3,09$ , porém esses valores se

encontravam acima da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, que variou entre 10 e 34 mg/dL.

→Creatinina: no grupo de fêmeas o grupo controle apresentou valores de 0,64 mg/dL  $\pm$  0,02, e de acordo como teste de Tamhane, houve aumento estatisticamente significativo na dose de 200 mg/kg ( $p = 0,023$ ) com valores de 0,96 mg/dL  $\pm$ 0,04; porém este valor se encontrava dentro da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, cujo valor variou entre 0,8 e 1,8. Contudo o grupo controle e as doses de 5, 50 e 300 mg/kg, com valores de 0,66 mg/dL  $\pm$  0,06; 0,56 mg/dL  $\pm$  0,02 e 0,78 mg/dL  $\pm$  0,05 respectivamente, se apresentaram abaixo dos valores de referência.

→Ácido úrico: no grupo de fêmeas o grupo controle apresentou valores de 0,40 mg/dL  $\pm$  0,04, e de acordo como teste de Bonferroni, houve diminuição estatisticamente significativa na dose de 5 mg/kg ( $p = 0,002$ ) com valores de 0,38 mg/dL  $\pm$  0,04; e na dose de 50 mg/kg ( $p = 0,002$ ) com valores de 0,38 mg/dL  $\pm$  0,04; contudo tanto o grupo controle e os experimentais 5 e 50 mg/kg bem como as doses de 300 e 2000 mg/kg com valores de 0,36 mg/dL  $\pm$  0,04 e 0,36 mg/dL  $\pm$  0,04 respectivamente se encontram abaixo da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, cujo valor variou de 0,8 a 4,4 mg/dL. Já no grupo de machos o grupo controle apresentou valores de 0,15 mg/dL  $\pm$  0,01, e de acordo com o teste de Bonferroni, houve diminuição estatisticamente significativa na dose de 5 mg/kg ( $p = 0,002$ ) com valores de 0,12 mg/dL  $\pm$  0,02; e aumento estatisticamente significativo na dose de 300 mg/kg ( $p = 0,004$ ) com valores de 0,31 mg/dL  $\pm$  0,04; e a dose de 2000 mg/kg ( $p = 0,004$ ) com valores de 0,36 mg/dL  $\pm$  0,06; cujos valores tanto do grupo controle e dos experimentais estavam abaixo da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, que variou de 0,8 a 4,4 mg/dL.

→Fósforo: no grupo de fêmeas o grupo controle apresentou valores de 6,88 mg/dL  $\pm$  0,22, e de acordo como teste de Tamhane, houve diminuição estatisticamente significativa na dose de 5 mg/kg ( $p = 0,007$ ) com valores de 5,74 mg/dL  $\pm$  0,30; e aumento estatisticamente significativo na dose de 50 mg/kg ( $p = 0,002$ ) com valores de 6,76 mg/dL  $\pm$  0,18, na dose de 300 mg/kg ( $p = 0$ ) com valores de 7,64 mg/dL  $\pm$ 0,27; e na dose de 2000 mg/kg ( $p = 0,001$ ) com valores de 7,54 mg/dL  $\pm$ 0,16. Tanto o grupo controle quanto os grupos experimentais apresentaram valores acima da

faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, que variou entre 1,2 e 4,9 mg/dL.

→Fosfatase alcalina: no grupo de fêmeas o grupo controle apresentou valores de 137,00 U/L  $\pm$  12,39, e de acordo como teste de Bonferroni, houve diminuição estatisticamente significativa na dose de 5 mg/kg ( $p = 0,006$ ) com valores de 135,40 U/L  $\pm$  14,54, na dose de 50 mg/kg ( $p = 0,011$ ) com valores de 108,60 U/L  $\pm$  10,47; e houve aumento estatisticamente significativo na dose de 2000 mg/kg ( $p = 0,023$ ) com valores de 155,00 U/L  $\pm$  8,98. O grupo controle e as doses de 5 e 50 mg/kg se encontravam na dentro da faixa de variação do valor de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado cuja variação foi de 90 a 145 U/L; porém a dose de 2000 mg/kg estava um pouco acima desta variação. Já no grupo de machos o grupo controle variou em 243,50 U/L  $\pm$  25,35, e de acordo como teste de Tamhane, somente a dose de 300 mg/kg ( $p = 0,036$ ) com valores de 208,00 U/L  $\pm$  11,92 apresentou aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, contudo porém as doses experimentais de 5, 50 e 2000 mg/kg, com valores de 213,12 U/L  $\pm$  12,94; 192,20  $\pm$  14,90 U/L e 202,26  $\pm$  13,82 U/L respectivamente também apresentaram valores acima da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, cujo valor foi de 90 a 145 U/L.

→Colesterol: no grupo dos machos o grupo controle apresentou valores de 49,22 mg/dL  $\pm$  8,23, e de acordo com o teste de Bonferroni, houve diminuição estatisticamente significativa na dose 5 mg/kg ( $p = 0,007$ ) com valores de 36,46 mg/dL  $\pm$  4,44. Contudo todos os valores do grupo controle e grupos experimentais apresentaram valores dentro da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, que foi de 35 a 53 mg/dL.

→Proteínas totais: no grupo dos machos o grupo controle apresentou valores de 5,46 g/dL  $\pm$  0,14, e de acordo com o teste de Bonferroni, todas as doses apresentaram aumentos estatisticamente significantes, onde a dose 5 mg/kg apresentou  $p = 0,005$  e valores de 5,88 g/dL  $\pm$  0,32; a dose 50 mg/kg apresentou  $p = 0,005$  e valores de 5,42 g/dL  $\pm$  0,06; a dose 300 mg/kg apresentou  $p = 0$  e valores de 5,18 g/dL  $\pm$  0,03 e a dose 2000 mg/kg apresentou  $p = 0$  e valores de 5,38 g/dL  $\pm$  0,12; porém também esses valores se encontravam dentro da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado, cujo valor foi de 5,5 a 7,2 g/dL.

Nos demais parâmetros, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos experimentais.

Tabela 11: Avaliação bioquímica sérica de coelhos Nova Zelândia albino machos, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.

	Valores Referenciais	JME 173 (n=5)				
		Controle	5 mg/Kg	50 mg/Kg	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
<b>Machos</b>						
Na (mEq/L)	138 a 148	142,60 ± 2,93	149,00 ± 0,71	144,80 ± 0,86	155,40 ± 1,94	152,60 ± 1,50
K (mEq/L)	3,3 a 6,9	3,68 ± 0,12	<b>3,94 ± 0,07*</b>	<b>3,92 ± 0,16*</b>	4,46 ± 0,29	4,90 ± 0,18
Glicose (mg/dL)	75 a 145	172,90 ± 7,03	174,52 ± 7,36	<b>189,76 ± 20,26*</b>	183,18 ± 12,24	<b>177,98 ± 10,06*</b>
Uréia (mg/dL)	10 a 34	31,50 ± 3,53	33,52 ± 3,58	37,82 ± 2,24	46,06 ± 3,17	46,96 ± 3,09
Creatinina (mg/dL)	0,8 a 1,8	0,75 ± 0,06	0,67 ± 0,02	0,72 ± 0,05	0,54 ± 0,03	0,49 ± 0,03
Ácido Úrico (mg/dL)	0,8 a 4,4	0,15 ± 0,01	0,12 ± 0,04	<b>0,12 ± 0,02*</b>	<b>0,31 ± 0,04*</b>	<b>0,36 ± 0,06*</b>
Albumina (g/dL)	2 a 4,6	3,58 ± 0,22	3,58 ± 0,21	3,70 ± 0,25	3,54 ± 0,21	3,48 ± 0,19
P (mg/dL)	1,2 a 4,9	4,82 ± 0,12	5,02 ± 0,06	4,98 ± 0,15	4,48 ± 0,21	4,66 ± 0,22
AST (U/L)	31 a 53	58,16 ± 14,98	39,06 ± 11,81	51,00 ± 8,03	51,42 ± 8,82	39,06 ± 9,05
ALT (U/L)	28 a 153	74,90 ± 10,93	78,38 ± 10,17	56,94 ± 17,09	58,78 ± 19,61	84,94 ± 2,37
FA (U/L)	90 a 145	243,50 ± 25,35	213,12 ± 12,94	192,20 ± 14,90	<b>208,00 ± 11,92*</b>	202,26 ± 13,82
Colesterol (mg/dL)	35 a 53	49,22 ± 8,23	<b>36,46 ± 4,44*</b>	35,79 ± 2,05	41,22 ± 3,14	52,71 ± 7,58
PTN total (g/dL)	5,5 a 7,2	5,46 ± 0,14	<b>5,88 ± 0,32*</b>	<b>5,42 ± 0,06*</b>	<b>5,18 ± 0,03*</b>	<b>5,38 ± 0,12*</b>

Na, Sódio; K, Potássio; P, Fósforo; AST, Aspartato Aminotransferase; ALT, Alanina Aminotransferase; FA, Fosfatase Alcalina; PTN tot, Proteínas totais.

Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=5 por grupo experimental).

\*Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05).

Tabela 12: Avaliação bioquímica sérica de coelhos Nova Zelândia albino fêmeas, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.

	Valores Referenciais	JME 173 (n=5)				
		Controle	5 mg/Kg	50 mg/Kg	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
<b>Fêmeas</b>						
Na (mEq/L)	138 a 148	146,20 ± 2,65	145,20 ± 2,54	142,60 ± 1,44	129,80 ± 1,77	132,60 ± 0,60
K (mEq/L)	3,3 a 6,9	5,02 ± 0,33	<b>4,86 ± 0,18*</b>	<b>4,72 ± 0,17*</b>	4,52 ± 0,30	4,32 ± 0,29
Glicose (mg/dL)	75 a 145	137,40 ± 5,64	133,40 ± 6,43	132,00 ± 4,20	133,80 ± 9,33	143,00 ± 10,65
Uréia (mg/dL)	10 a 34	30,70 ± 3,38	32,86 ± 4,69	26,32 ± 1,87	<b>32,58 ± 2,14*</b>	<b>35,20 ± 0,95*</b>
Creatinina (mg/dL)	0,8 a 1,8	0,64 ± 0,02	0,66 ± 0,06	0,56 ± 0,02	0,78 ± 0,05	<b>0,96 ± 0,04*</b>
Ácido Úrico (mg/dL)	0,8 a 4,4	0,40 ± 0,04	<b>0,38 ± 0,04*</b>	<b>0,38 ± 0,04*</b>	0,36 ± 0,04	0,36 ± 0,04
Albumina (g/dL)	2 a 4,6	2,96 ± 0,10	3,60 ± 0,47	3,06 ± 0,10	3,32 ± 0,37	3,14 ± 0,12
P (mg/dL)	1,2 a 4,9	6,88 ± 0,22	<b>5,74 ± 0,30*</b>	<b>6,76 ± 0,18*</b>	<b>7,64 ± 0,27*</b>	<b>7,54 ± 0,16*</b>
AST (U/L)	31 a 53	38,80 ± 6,79	72,00 ± 16,54	61,40 ± 12,92	72,18 ± 3,42	202,60 ± 65,68
ALT (U/L)	28 a 153	56,40 ± 3,26	109,80 ± 17,44	99,80 ± 21,78	98,56 ± 8,92	87,60 ± 8,51
FA (U/L)	90 a 145	137,00 ± 12,39	<b>135,40 ± 14,54*</b>	129,40 ± 10,25	<b>108,60 ± 10,47*</b>	<b>155,00 ± 8,98*</b>
Colesterol (mg/dL)	35 a 53	93,80 ± 15,23	<b>132,60 ± 18,41*</b>	112,80 ± 13,55	79,00 ± 13,99	101,80 ± 17,62
PTN total (g/dL)	5,5 a 7,2	4,68 ± 0,16	4,66 ± 0,17	4,66 ± 0,16	3,72 ± 0,10	3,94 ± 0,10

Na, Sódio; K, Potássio; P, Fósforo; AST, Aspartato Aminotransferase; ALT, Alanina Aminotransferase; FA, Fosfatase Alcalina; PTN tot, Proteínas totais.  
 Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=5 por grupo experimental).  
 \*Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05).

#### 4.6 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA

Durante o exame, não foram encontradas alterações anatomopatológicas macroscópicas em nenhum dos órgãos descritos no item 4.4.4, conforme apresentado na tabela 13 para a espécie rato Wistar:

Tabela 13: Resultados Anatomopatológicos do exame macroscópico em ratos Wistar

	<b>JME 173 (n=5)</b>				
	<b>Controle</b>	<b>5 mg/kg</b>	<b>50 mg/kg</b>	<b>300 mg/kg</b>	<b>2000mg/kg</b>
<b>Machos</b>	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
<b>Fêmeas</b>	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações

E na espécie coelhos Nova Zelândia albino, também não foram encontradas alterações anatomopatológicas macroscópicas em nenhum dos órgãos descritos no item 4.4.4, conforme apresentado na tabela 14:

Tabela 14: Resultados Anatomopatológicos do exame macroscópico em coelhos Nova Zelândia albino.

	<b>JME 173 (n=5)</b>				
	<b>Controle</b>	<b>5 mg/kg</b>	<b>50 mg/kg</b>	<b>300 mg/kg</b>	<b>2000mg/kg</b>
<b>Machos</b>	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
<b>Fêmeas</b>	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações

Todos os órgãos, vísceras e linfonodos analisados estavam em posição típicas, com aspecto e coloração normais. Foram observados também os demais órgãos, vísceras e linfonodos não listados no presente trabalho, e nenhuma alteração anatomopatológica macroscópica digna de anotação foi encontrada.



## 4.7 AVALIAÇÃO DO PESO DOS ÓRGÃOS

Após a avaliação macroscópica, os órgãos selecionados no item 4.4.4, foram retirados e dissecados, a fim de se realizar a pesagem, para a anotação do peso absoluto.

Não foram observadas em nenhum dos órgãos avaliados, alterações que fossem dignas de anotação.

Na avaliação do peso absoluto e relativo dos órgãos dos ratos Wistar, apresentados nas tabelas 15 e 16. No grupo de fêmeas, de acordo com o teste de Bonferroni, o coração foi o único órgão que apresentou aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle que apresentou valores de 0,60 g  $\pm$  0,06 para o peso absoluto e 2,90 mg/g  $\pm$  0,31 para o peso relativo; na dose 5 mg/kg ( $p = 0,018$ ) valores de 0,84 g  $\pm$  0,02 para o peso absoluto e 3,74 mg/g  $\pm$  0,11 para o peso relativo; bem como na dose 300 mg/kg ( $p = 0,004$ ) valores de 0,88 g  $\pm$  0,05 para o peso absoluto e 3,90 mg/g  $\pm$  0,25 para o peso relativo. Já no grupo dos machos, também de acordo com o teste de Bonferroni, o baço foi o único órgão que apresentou diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo controle que apresentou valores de 0,88 g  $\pm$  0,01 para o peso absoluto e 3,47 mg/g  $\pm$  0,07 para o peso relativo; a dose 50 mg/kg ( $p = 0,001$ ) apresentou valores de 0,66 g  $\pm$  0,02 para o peso absoluto e 2,66 mg/g  $\pm$  0,12 para o peso relativo; e a dose 300 mg/kg ( $p = 0,003$ ) apresentou valores de 0,68 g  $\pm$  0,04 para o peso absoluto e 2,82 mg/g  $\pm$  0,15 para o peso relativo.

Já na avaliação do peso absoluto e relativo dos órgãos dos coelhos, conforme apresentados nas tabelas 17 e 18, somente no grupo de coelhos fêmea, segundo o teste de Bonferroni, o timo foi o órgão que apresentou diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e apresentou valores de 4,70 g  $\pm$  0,13 para o peso absoluto e 2,06 mg/g  $\pm$  0,15 para o peso relativo; e na dose 50 mg/kg ( $p = 0,148$ ) valores de 4,46 g  $\pm$  0,07 para o peso absoluto e 1,96 mg/g  $\pm$  0,07 para o peso relativo.

Tabela 15: Avaliação do peso absoluto e relativo dos órgãos de ratos Wistar machos, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.

		JME 173 (n=5)				
		Controle	5 mg/Kg	50 mg/Kg	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
<b>Machos</b>						
Baço	(g)	0,88 ± 0,01	0,82 ± 0,05	<b>0,66 ± 0,02*</b>	<b>0,68 ± 0,04*</b>	0,85 ± 0,03
	mg/g PC	3,47 ± 0,07	3,17 ± 0,18	<b>2,66 ± 0,12*</b>	<b>2,82 ± 0,15*</b>	3,50 ± 0,12
Fígado	(g)	13,44 ± 0,70	14,28 ± 1,21	13,57 ± 0,83	13,45 ± 0,44	16,26 ± 0,99
	mg/g PC	52,91 ± 2,42	55,19 ± 4,17	54,62 ± 3,68	55,97 ± 2,03	66,91 ± 4,01
Pâncreas	(g)	1,18 ± 0,04	1,25 ± 0,05	1,14 ± 0,05	1,42 ± 0,11	1,45 ± 0,13
	mg/g PC	4,67 ± 0,17	4,84 ± 0,19	4,59 ± 0,26	5,89 ± 0,46	5,94 ± 0,47
Rim E	(g)	1,27 ± 0,04	1,14 ± 0,05	1,09 ± 0,04	1,17 ± 0,04	1,34 ± 0,05
	mg/g PC	5,01 ± 0,17	4,43 ± 0,24	4,38 ± 0,16	4,87 ± 0,22	5,50 ± 0,19
Rim D	(g)	1,23 ± 0,02	1,18 ± 0,03	1,09 ± 0,02	1,18 ± 0,03	1,36 ± 0,05
	mg/g PC	4,87 ± 0,11	4,58 ± 0,16	4,37 ± 0,13	4,90 ± 0,18	5,60 ± 0,20
Linfo M	(g)	0,22 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,30 ± 0,01
	mg/g PC	0,85 ± 0,09	0,73 ± 0,10	0,90 ± 0,09	0,90 ± 0,04	1,23 ± 0,03
Pulmão	(g)	1,72 ± 0,08	1,92 ± 0,03	1,88 ± 0,04	1,76 ± 0,06	1,72 ± 0,02
	mg/g PC	6,79 ± 0,30	7,43 ± 0,13	7,56 ± 0,24	7,33 ± 0,23	7,09 ± 0,13
Coração	(g)	1,08 ± 0,03	1,10 ± 0,07	1,15 ± 0,04	1,13 ± 0,04	1,15 ± 0,02
	mg/g PC	4,27 ± 0,10	4,24 ± 0,27	4,61 ± 0,19	4,72 ± 0,19	4,74 ± 0,12
Timo	(g)	0,67 ± 0,06	0,77 ± 0,05	0,68 ± 0,03	0,64 ± 0,04	0,58 ± 0,02
	mg/g PC	2,63 ± 0,26	2,98 ± 0,20	2,72 ± 0,15	2,67 ± 0,16	2,39 ± 0,10

Rim E, Rim esquerdo; Rim D, Rim direito; Linfo M, Linfonodo mesentérico; PC, Peso Corporal.

Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=5 por grupo experimental) da relação do peso do órgão (mg) / peso do animal (g).

\*Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05)

Tabela 16: Avaliação do peso absoluto e relativo dos órgãos de ratos Wistar fêmeas, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.

		JME 173 (N=5)				
		Controle	5 mg/kg	50 mg/kg	300 mg/kg	2000 mg/kg
<b>Fêmeas</b>						
Baço	(g) mg/g PC	0,69 ± 0,04 3,28 ± 0,10	0,71 ± 0,04 3,16 ± 0,16	0,72 ± 0,02 3,38 ± 0,12	0,72 ± 0,04 3,18 ± 0,19	0,72 ± 0,07 3,34 ± 0,30
Fígado	(g) mg/g PC	8,71 ± 0,59 41,82 ± 2,63	11,27 ± 0,88 49,82 ± 2,29	10,57 ± 0,61 49,47 ± 3,14	10,32 ± 0,62 45,71 ± 2,89	8,64 ± 0,72 40,06 ± 2,91
Pâncreas	(g) mg/g PC	1,13 ± 0,08 5,40 ± 0,29	1,34 ± 0,08 5,94 ± 0,33	1,21 ± 0,06 5,67 ± 0,24	1,07 ± 0,06 4,73 ± 0,26	1,17 ± 0,10 5,42 ± 0,37
Rim E	(g) mg/g PC	0,86 ± 0,05 4,11 ± 0,17	1,08 ± 0,10 4,81 ± 0,43	0,96 ± 0,05 4,45 ± 0,15	1,03 ± 0,05 4,57 ± 0,20	0,96 ± 0,02 4,48 ± 0,09
Rim D	(g) mg/g PC	0,89 ± 0,06 4,25 ± 0,26	1,04 ± 0,06 4,63 ± 0,16	1,02 ± 0,04 4,76 ± 0,18	1,04 ± 0,04 4,61 ± 0,16	0,99 ± 0,02 4,59 ± 0,15
Linfo M	(g) mg/g PC	0,18 ± 0,04 0,87 ± 0,17	0,17 ± 0,01 0,78 ± 0,06	0,23 ± 0,06 1,10 ± 0,29	0,23 ± 0,01 1,03 ± 0,05	0,21 ± 0,02 0,99 ± 0,09
Pulmão	(g) mg/g PC	1,07 ± 0,04 5,12 ± 0,13	1,24 ± 0,07 5,50 ± 0,25	1,00 ± 0,06 4,69 ± 0,31	1,19 ± 0,07 5,28 ± 0,34	1,12 ± 0,07 5,19 ± 0,28
Coração	(g) mg/g PC	0,60 ± 0,06 2,90 ± 0,31	<b>0,84 ± 0,02*</b> <b>3,74 ± 0,11*</b>	0,81 ± 0,02 3,78 ± 0,17	<b>0,88 ± 0,05*</b> <b>3,90 ± 0,25*</b>	0,76 ± 0,06 3,54 ± 0,22
Timo	(g) mg/g PC	0,38 ± 0,05 1,81 ± 0,22	0,45 ± 0,06 1,99 ± 0,27	0,78 ± 0,01 3,63 ± 0,09	0,41 ± 0,02 1,80 ± 0,08	0,38 ± 0,05 1,77 ± 0,18

Rim E, Rim esquerdo; Rim D, Rim direito; Linfo M, Linfonodo mesentérico; PC, Peso Corporal.

Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=5 por grupo experimental) da relação do peso do órgão (mg) / peso do animal (g).

\*Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05)

Tabela 17: Peso absoluto e relativo dos órgãos de coelhos Nova Zelândia machos, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.

		JME 173 (n=5)				
		Controle	5 mg/Kg	50 mg/Kg	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
<b>Machos</b>						
Baço	(g)	0,94 ± 0,05	1,08 ± 0,09	0,76 ± 0,22	1,04 ± 0,09	1,12 ± 0,08
	mg/g PC	0,39 ± 0,02	0,46 ± 0,05	0,33 ± 0,10	0,45 ± 0,03	0,49 ± 0,03
Fígado	(g)	74,56 ± 2,11	82,06 ± 4,95	81,28 ± 4,41	73,82 ± 2,59	80,14 ± 3,01
	mg/g PC	30,75 ± 0,81	35,17 ± 2,91	34,61 ± 1,72	31,79 ± 1,44	35,15 ± 1,55
Pâncreas	(g)	7,28 ± 0,22	7,24 ± 0,27	7,12 ± 0,10	7,02 ± 0,17	7,06 ± 0,05
	mg/g PC	3,00 ± 0,08	3,09 ± 0,15	3,04 ± 0,11	3,02 ± 0,08	3,10 ± 0,07
Rim E	(g)	7,86 ± 0,21	8,06 ± 0,14	7,92 ± 0,08	7,86 ± 0,20	8,02 ± 0,12
	mg/g PC	3,24 ± 0,07	3,44 ± 0,13	3,38 ± 0,10	3,38 ± 0,10	3,52 ± 0,11
Rim D	(g)	7,88 ± 0,19	8,08 ± 0,06	8,00 ± 0,06	8,00 ± 0,21	7,86 ± 0,17
	mg/g PC	3,25 ± 0,07	3,45 ± 0,10	3,41 ± 0,10	3,44 ± 0,10	3,44 ± 0,09
Linfo M	(g)	2,24 ± 0,15	2,04 ± 0,05	1,92 ± 0,09	2,20 ± 0,08	2,12 ± 0,06
	mg/g PC	0,93 ± 0,07	0,87 ± 0,02	0,82 ± 0,03	0,95 ± 0,04	0,93 ± 0,04
Pulmão	(g)	8,72 ± 0,34	8,90 ± 0,13	8,80 ± 0,23	9,10 ± 0,27	8,92 ± 0,12
	mg/g PC	3,60 ± 0,14	3,80 ± 0,15	3,75 ± 0,12	3,93 ± 0,21	3,91 ± 0,08
Coração	(g)	5,84 ± 0,10	6,20 ± 0,32	6,06 ± 0,10	5,68 ± 0,16	5,72 ± 0,27
	mg/g PC	2,41 ± 0,04	2,66 ± 0,20	2,59 ± 0,08	2,45 ± 0,10	2,51 ± 0,12
Timo	(g)	4,86 ± 0,11	4,66 ± 0,13	4,92 ± 0,13	4,88 ± 0,23	4,50 ± 0,23
	mg/g PC	2,00 ± 0,04	1,99 ± 0,10	2,10 ± 0,08	2,09 ± 0,07	1,97 ± 0,11

Rim E, Rim esquerdo; Rim D, Rim direito; Linfo M, Linfonodo mesentérico; PC, Peso Corporal.

Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=5 por grupo experimental) da relação do peso do órgão (mg) / peso do animal (g).

\*Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05)

Tabela 18: Peso absoluto e relativo dos órgãos de coelhos Nova Zelândia albino fêmeas, 14 dias após a administração oral com dose única de JME-173.

		JME 173 (n=5)				
		Controle	5 mg/Kg	50 mg/Kg	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
<b>Fêmeas</b>						
Baço	(g)	1,12 ± 0,08	1,04 ± 0,17	0,98 ± 0,12	1,13 ± 0,08	1,12 ± 0,06
	mg/g PC	0,49 ± 0,04	0,46 ± 0,07	0,45 ± 0,05	0,56 ± 0,03	0,52 ± 0,03
Fígado	(g)	81,84 ± 4,02	80,66 ± 7,05	94,54 ± 3,04	87,28 ± 2,52	82,38 ± 3,10
	mg/g PC	35,51 ± 1,14	36,13 ± 2,91	43,40 ± 1,93	43,00 ± 1,39	38,05 ± 2,00
Pâncreas	(g)	6,48 ± 0,20	6,20 ± 0,60	6,46 ± 0,32	6,64 ± 0,32	6,62 ± 0,20
	mg/g PC	2,84 ± 0,21	2,78 ± 0,27	2,96 ± 0,14	3,27 ± 0,17	3,05 ± 0,08
Rim E	(g)	7,94 ± 0,07	8,34 ± 0,29	8,06 ± 0,15	8,06 ± 0,07	8,04 ± 0,05
	mg/g PC	3,47 ± 0,17	3,74 ± 0,12	3,70 ± 0,13	3,97 ± 0,08	3,71 ± 0,08
Rim D	(g)	8,08 ± 0,10	8,30 ± 0,13	8,16 ± 0,05	7,94 ± 0,08	8,10 ± 0,05
	mg/g PC	3,53 ± 0,19	3,73 ± 0,12	3,74 ± 0,08	3,91 ± 0,07	3,73 ± 0,09
Linfo M	(g)	2,16 ± 0,11	2,32 ± 0,04	2,12 ± 0,11	2,08 ± 0,09	2,00 ± 0,07
	mg/g PC	0,94 ± 0,05	1,04 ± 0,03	0,97 ± 0,06	1,02 ± 0,04	0,92 ± 0,03
Pulmão	(g)	9,06 ± 0,31	8,88 ± 0,07	8,86 ± 0,30	8,84 ± 0,11	9,08 ± 0,44
	mg/g PC	3,95 ± 0,18	3,99 ± 0,09	4,05 ± 0,09	4,35 ± 0,07	4,17 ± 0,15
Coração	(g)	5,84 ± 0,09	5,90 ± 0,31	6,02 ± 0,09	5,90 ± 0,03	6,00 ± 0,04
	mg/g PC	2,55 ± 0,09	2,65 ± 0,16	2,76 ± 0,06	2,91 ± 0,04	2,76 ± 0,03
Timo	(g)	4,70 ± 0,13	4,68 ± 0,15	<b>4,26 ± 0,07*</b>	4,58 ± 0,06	4,64 ± 0,14
	mg/g PC	2,06 ± 0,15	2,10 ± 0,06	<b>1,96 ± 0,07*</b>	2,26 ± 0,03	2,14 ± 0,10

Rim E, Rim esquerdo; Rim D, Rim direito; Linfo M, Linfonodo mesentérico; PC, Peso Corporal.

Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=5 por grupo experimental) da relação do peso do órgão (mg) / peso do animal (g).

\*Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05)

## 5 DISCUSSÃO

O estudo de toxicidade oral aguda é o primeiro dos testes toxicológicos a ser realizado no desenvolvimento de novos fármacos, e tem como objetivo caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração única ou dividida ao longo de 24 horas. A partir dele é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvo, efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, bioquímicas, anatomo e histopatológicas (BRASIL, 2010 e OECD, 2001).

Este trabalho propôs um estudo não clínico de toxicidade oral aguda de um análogo da mexiletina, a molécula JME-173, candidato a fármaco antiasmático, adotando o protocolo da OECD nº 420 e o Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança, necessários ao desenvolvimento de medicamentos da ANVISA.

Apesar de alguma disparidade em alguns aspectos entre os guias, o fato de essa inédita molécula ser de uma linha de pesquisa do IOC/FIOCRUZ na busca por inovação terapêutica contra a asma, e ter tido bons resultados nos testes *in vitro* (COSTA, 2005; OLSEN, 2011; OLSEN e MARTINS, 2013; SERRA et al, 2012), achou-se mais prudente aplicar o princípio da “precaução” na condução do presente trabalho, contemplando-se o maior número possível de aspectos de ambos os guias, na esperança de que a molécula JME-173 dê continuidade aos ensaios clínicos necessários até seu registro e posterior comercialização.

Em relação à ocorrência de óbito de um ou mais animais, considerando que este seria o principal desfecho para o final do teste de toxicidade aguda oral, segundo os guias utilizados para a condução do presente estudo, a molécula JME-173 não foi capaz de causar óbito em nenhuma das duas espécies, roedora e não roedora como recomenda os guias utilizados, mesmo utilizando-se a dose de 2000 mg/kg, que seria quase quatro vezes a dose pré-estabelecida para DL<sub>50</sub> em animais de experimentação segundo a bula do medicamento Mexitil® (DEF, 2015) e cuja dose terapêutica da JME-173 proposta pra seu uso como tratamento antiasmático é de 1 a 5 mg/kg (FIOCRUZ, 2013).

Santos (2012) cita em seu estudo, a perda de peso como um importante indicativo de efeitos tóxicos, de acordo com o Programa Nacional de Toxicologia – NTP dos Estados Unidos, frisando que a perda de peso em ensaios toxicológicos

não deve ser mais do que 10 % do seu peso corporal inicial (GONÇALVES, 2001 e YUN et al, 2015). Os resultados apresentados neste estudo para a avaliação do ganho de peso corporal de ratos e coelhos demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e o grupo controle, e todos os resultados encontrados estão de acordo com os valores fisiológicos para a faixa etária utilizada, segundo Couto (2006), encontrados no biotério de criação de origem de ambas as espécies utilizadas (MOURA e MATARAIA, 2009; EBSUI, FONTES e LAPCHIK, 2009).

Em relação ao consumo de ração, não foi verificada nenhuma alteração estatisticamente significativa entre os grupos experimentais do presente estudo, pois apresentaram o mesmo padrão para ingestão de ração em relação ao grupo controle e também em relação às referências científicas do biotério de criação de origem cujos valores são de 10 a 20 g para a espécie rato Wistar e de 75 a 130 g para a espécie de coelho Nova Zelândia albino (COUTO, 2006).

A determinação do consumo de ração é muito importante nos estudos de segurança de produtos com finalidade terapêutica, uma vez que a ingestão adequada é essencial para a manutenção fisiológica do animal e para se obter resposta adequada ao experimento realizado (KO, MATTARAIA, 2009 e SANTOS, 2012). Os resultados da avaliação de peso corporal e de ingestão alimentar, conjuntamente, sugerem que a molécula JME-173 não afeta a apetência e nem o ganho de peso corporal em ambas as espécies utilizadas no presente estudo, sendo assim um indicativo de segurança da mesma (SANTOS, 2012).

A observação diária dos sinais clínicos foi considerada de fundamental importância, por ser a JME-173 uma molécula nova, congênere uma droga antiarrítmica, muito susceptível de sinais de intoxicação cardiológica (FIOCRUZ, 2013; GOODMAN e GILDMAN, 2006; ROENN et al, 2011). Alguns autores citam sintomas como náuseas e enjoos, que não são passíveis de mensuração na experimentação animal (DEF, 2015; GOODMAN e GILDMAN, 2006), sendo esses sinais melhor elucidados pela observação de ingestão alimentar e ganho de peso.

Porém outros sinais bastante citados pelas referências científicas sobre a mexiletina incluem sintomas como confusão mental, tremores, ataxia ou mesmo síncope, que foram contemplados na coletânea pré-estabelecida para o presente estudo. Na observação dos sinais clínicos diários não foi observado alterações que pudessem sugerir características tóxicas ao uso da molécula JME-173.

As avaliações hematológicas e bioquímicas séricas são de extrema valia nos testes toxicológicos, pois fornece dados sobre a homeostase do animal frente o desafio imposto. Vários autores (ANDRADE et al, 2006. RIVERA, 2009 e MELO et al, 2012) apontam que os animais experimentais não se comportam do mesmo modo nas condições a que estão submetidos nos diferentes países onde são mantidos em cativeiro, e de forma geral os valores dos parâmetros fisiológicos dos animais de experimentação são determinados por outros países com longa tradição de manutenção de biotérios e permanecem como constantes para os animais de uma mesma linhagem no mundo. Dessa forma, a inclusão do grupo controle fornece dados de grande valor como ponto de partida para diversos estudos, possibilitando a obtenção de resultados confiáveis sobre estes parâmetros (MELO et al, 2012).

O hemograma avalia quantitativa e qualitativamente as células sanguíneas do indivíduo, ajuda identificar distúrbios tais como: anemias, leucemias, alergias, infecções bacterianas e virais, processos inflamatórios, entre outros (MOURA e MATTARAIA, 2009; EBSUI, FONTES e LAPICK et al, 2009; STOCKHAM e SCOTT, 2012; MELO et al, 2012).

O parâmetro hematócrito indica a porcentagem de hemácias no sangue sendo um dos indicadores de anemia ou policitemia, a fim de classificá-las levando-se em consideração o tamanho e a morfologia das hemácias (STOCKHAM e SCOTT, 2012). Na avaliação do hematócrito da espécie coelho, houve aumento estatisticamente significativo no grupo de fêmeas nas doses de 5 e 50 mg/kg; bem como aumento estatisticamente significativo do VCM nas doses de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg; e aumento estatisticamente significativo do HCMC na dose de 5 mg/kg.

No grupo dos coelhos machos, houve aumento estatisticamente significativo do hematócrito nas doses 5, 300 e 2000 mg/kg, acompanhados de aumento do VCM também nas doses 5, 300 e 2000 mg/kg; e aumento estatisticamente significativo do HCMC nas doses 50 e 300 mg/kg; e aumento estatisticamente significativo do HCMC nas doses de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. Contudo, todos esses valores se encontravam dentro da faixa de normalidade dos valores referenciais do laboratório onde foi analisado o material.

Já no grupo dos ratos houve diminuição estatisticamente significativa no hematócrito nas fêmeas, na dose de 300 mg/kg, porém dentro da faixa de normalidade dos valores referenciais do laboratório onde foi analisado o material.



Esta condição clínica poderia ser observada como alteração, porém os resultados obtidos neste estudo encontravam-se na faixa de normalidade estabelecida pelos laboratórios que realizaram as análises e com a literatura de biotérios brasileiros (EBSUI, FONTES e LAPICHIK et al, 2009; MELO et al, 2012), bem como a faixa etária utilizada.

Alguns fatores podem ser causadores deste aumento dentro da faixa de normalidade fisiológica, como por exemplo, a mobilização esplênica, comum ao uso da droga anestésica cetamina, que irá produzir valores altos e é especialmente comum em animais excitados/estressados, sem necessariamente haver esplenomegalia (STOCKHAM e SCOTT, 2011), como muitos valores dos grupos controle também se encontravam acima da faixa de normalidade dos valores referenciais do laboratório onde foi analisado o material, sugere-se que essas alterações não sejam atribuídas uso da JME-173.

Os leucócitos são um grupo de células originárias das células pluripotenciais oriundas da medula óssea, presentes no sangue, linfa, órgãos linfoides e vários outros tecidos. Tem por objetivo combater e a eliminar microrganismos e estruturas químicas estranhas ao organismo (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Na espécie de coelhos no grupo de fêmeas, observou-se aumento estatisticamente significativo na dose de 5 mg/kg em relação ao grupo controle, bem como em relação aos valores de referências do laboratório onde a análise foi realizada.

Stockham e Scott (2011) cita que a contagem total dos leucócitos pode variar com a espécie animal e também é influenciada pela idade, demonstrando ser maior em indivíduos juvenis e diminuir gradualmente para atingir valores de adulto. A leucocitose neste caso pode ser considerada “fisiológica”, comum em animais jovens e geralmente é desencadeada por distúrbios emocionais e físicos, em resposta à adrenalina liberada e o compartimento marginal dos leucócitos são mobilizados para a circulação geral, aumentando a contagem total, visto não ter sido observado aumento deste parâmetro nas demais doses, além da provável ação anti-inflamatória do grupo de moléculas análogas a mexiletina observado nos testes *in vitro* citados por Olsen e Martins (2012).

Na avaliação das plaquetas, no grupo de coelhos, houve aumento estatisticamente significativo em todas as doses testadas nas fêmeas, e no grupo de machos, houve diminuição estatisticamente significativa nas doses de 300 mg/kg e

2000 mg/kg, contudo, esses valores se encontraram dentro da faixa de variação dos valores de referência informada pelo laboratório onde o material foi avaliado.

As plaquetas são produzidas na medula óssea, a partir da célula pluripotencial, sua função é a hemostasia primária, ou seja, logo que ocorre a lesão formando plug provisório, a fim de evitar o agravamento da hemorragia, enquanto a fibrina se forma. Assim como ocorre nas anemias, diversas são as causas dos distúrbios plaquetários, sendo as principais na redução: a medula óssea não produz plaquetas suficientes (doenças mieloproliferativas, ação anti-inflamatória inespecífica da mexiletina); as plaquetas são sequestradas pelo baço aumentado de volume (anestesia injetável com cetamina); um aumento da utilização ou da destruição das plaquetas (utilização de fármacos com essa característica).

Na bula do medicamento comercial Mexitil® (DEF, 2015) há relato a observação de leucopenia e trombocitopenia em casos raros de humanos. Segundo Gahart (2011), é bastante comum observar distúrbio plaquetários associada com neutropenia em drogas antiarrítmicas que alterem o traçado eletrocardiográfico no intervalo QT. Por se tratar de uma molécula análoga à mexiletina, entende-se esse ser um evento comum nessa classe de fármacos, sendo os pacientes com distúrbios de coagulação uma categoria restrita para seu futuro uso, assim sendo esta avaliação levou em consideração a ampla faixa de normalidade atribuída para as plaquetas (157-631 mil/mm<sup>3</sup>) e neste caso todas as doses testadas de JME-173 encontram-se dentro da faixa de variação.

Na avaliação bioquímica, semelhantemente a avaliação hematológica, a maioria dos parâmetros analisados variou dentro da faixa de normalidade estabelecida pelos laboratórios onde foi realizada a análise do material, mesmo quando havia diferença estatística, bem como alterações fora dessa faixa para os grupos controle.

Na avaliação do sódio, no grupo de coelhos, não houve diferenças estatísticas para ambos os sexos. Já no grupo dos ratos fêmea, ocorreu aumentos estatisticamente significativos nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg; porém os valores se encontravam dentro da faixa de variação da referência atribuída pelo laboratório onde foi processado o material. Já no grupo de machos a dose que apresentou aumento estatisticamente significativo foi a de 300 mg/kg, e esses valores se encontravam acima da faixa de variação da referência atribuída pelo laboratório onde foi processado o material, inclusive o próprio grupo controle.

Uma das prováveis causas para esse valores estarem tão próximo do limite dos valores referências na maioria dos animais testados é a ingestão de elevados teores de sódio na ração, cujos valores preconizados pelo National Research Council (1977) desse mineral na dieta dos animais de laboratório é de 500 mg/kg de dieta para ratos e a rotulagem da ração comercial utilizada durante o estudo, que foi a mesma ingerida em período em que se encontravam no biotério de criação, o valor de níveis mínimos desse item foi de 2700 mg/kg por kg do produto (COUTO, 2009; MOURA e MATTARAIA, 2009; MELO et al, 2012). Como alguns grupos controle também se encontravam próximo ao limite máximo tolerado, não se pode atribuir às alterações observadas ao uso da JME-173.

Na avaliação do potássio, no grupo de coelhos fêmea, houve diminuição estatisticamente significativa, nas doses de 5 e 50 mg/kg; e no grupo dos machos, houve aumento estatisticamente significativo, porém, esses valores se encontravam dentro da faixa de variação dos valores referências do laboratório onde foi processado o material. Já no grupo dos ratos, não houve nenhuma diferença estatística das doses experimentais para o grupo controle.

O potássio é filtrado nos glomérulos, reabsorvido nos túbulos contorcidos proximais e excretado pelos túbulos distais. Sua concentração sérica varia enormemente com a dieta (COUTO, 2006; MOURA e MATTARAIA, 2009). Segundo Couto (2006) e Moura e Mattaraia (2009), o recomendado pelo National Research Council (1977), para a concentração desse mineral na dieta de coelhos em 0,6% para a espécie dos coelhos e de 3,6% para a espécie de ratos.

Na rotulagem da ração comercial utilizada durante o estudo, que foi a mesma ingerida em período em que se encontravam no biotério de criação, o valor de níveis mínimos desse item não foi especificado, não podendo ser realizada uma análise mais conclusiva sobre o assunto.

Na avaliação de fósforo, encontraram-se alterações no grupo de coelhos fêmeas, onde houve diminuição estatisticamente significativa na dose de 5 mg/kg e aumento estatisticamente significativo nas doses de 50, 300 e 2000 mg/kg em relação ao grupo controle; contudo o grupo controle também se encontrava acima da faixa de variação dos valores referências do laboratório onde foi processado o material.

Segundo Stockham e Scott (2012) dietas cuja proteína de origem animal seja vísceras também podem causar hiperfosfatemia. Na rotulagem da ração comercial

utilizada no presente estudo, não havia informações sobre a origem da proteína, reforçando essa hipótese visto o aumento ser observado também nos grupos controle.

Na avaliação da glicose, no grupo de coelhos machos, houve aumentos estatisticamente significativos nas doses de 50 mg/kg; 300 mg/kg e 2000 mg/kg. No grupo de ratos machos, houve aumento estatisticamente significativo na dose de 300 mg/kg. Os tecidos em crescimento demandam energia para sua expansão, e é comum correlações positivas entre a concentração de glicose sanguínea e a taxa de crescimento (STOCKHAM e SCOTT, 2012), hipótese essa reforçada pelo fato desses animais estarem todos na faixa etária juvenil, ou seja, de 6 a 8 semanas.

Ressalta-se ainda, que não foi realizado jejum prévio para a coleta sanguínea, obedecendo as orientações dos guias quanto à finalização do teste, o que pode ter gerado resultados diferentes do esperado, contudo alguns valores apresentaram-se fora da faixa de normalidade dos valores referências do laboratório onde foi processado o material, e estatisticamente diferentes do controle; dessa forma nestes casos onde o grupo controle também se encontra fora da faixa de variação dos valores referencias, não podemos atribuir essas alterações ao uso da JME-173.

Na avaliação da uréia, no grupo de coelhos fêmea, houve aumento estatisticamente significativo nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg. Dieta com altos teores de proteína podem induzir o aumento da uréia plasmática por causa do aumento do catabolismo protéico. A deficiência energética dietética também aumenta o catabolismo protéico e eleva o nível de uréia no plasma, sugerindo o animal encontrar-se em hipoglicemia; o que não foi o caso pois todos os animais apresentaram hiperglicemia, mesmo os grupos controle, estando todos fora da faixa de variação informados pelo laboratório onde o material foi analisado. Como a dose de 300 mg/kg estava dentro desta faixa de variação já citada e houve aumento na dose de 2000 mg/kg; sugere-se que este aumento possa ser atribuído ao uso da JME-173.

Na avaliação da creatinina, no grupo de coelhos fêmeas, houve aumento estatisticamente significativo na dose de 2000 mg/kg. A excreção de creatinina é feita exclusivamente pela via renal, uma vez que ela não é reabsorvida nem reaproveitada e assim refletem a taxa de filtração renal (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Altos níveis indicam uma deficiência na funcionalidade renal. Dentre as causas de aumento devem ser consideradas uma azotemia pré-renal por diminuição

da perfusão renal, como por exemplo, na desidratação, azotemia renal devido à insuficiência renal real, ou ainda azotemia pós-renal por obstrução. A atividade muscular intensa ou prolongada também estão listadas dentre as causas consideradas fisiológicas, considerando que não houve sinais que indicasse disfunção renal no presente trabalho, e o grupo controle dos coelhos fêmea estavam abaixo da faixa de variação utilizada pelo laboratório onde o material foi analisado; e da mesma forma a dose de 2000 mg/kg se encontrava dentro desta faixa, apesar de diferente estatisticamente do controle.

Na avaliação do colesterol, no grupo de coelhos machos houve diminuição estatisticamente significativa na dose de 5 mg/kg, contudo o grupo controle e demais grupos experimentais se encontravam dentro da faixa de normalidade dos valores referências do laboratório onde foi processado o material. No grupo de coelhos fêmea houve aumento estatisticamente significativo na dose de 5 mg/kg, contudo o grupo controle e demais grupos experimentais se encontravam acima da faixa de normalidade dos valores referências do laboratório onde foi processado o material, Já no grupo ratos machos houve aumento estatisticamente significativo na dose de 2000 mg/kg e da mesma forma o grupo controle e demais grupos experimentais se encontravam acima da faixa de normalidade dos valores referências do laboratório onde foi processado o material.

Segundo Stockham e Scott (2012) o colesterol pode ser encontrado aumentado após uma refeição (hiperlipidemia pós-prandial). Assim como as dietas com alto teor de gordura resultam em hipercolesterolemia, o jejum também pode causar aumento de colesterol no plasma devido à mobilização de gorduras de reserva, ressaltando novamente que para este estudo não foi realizado jejum prévio para a coleta sanguínea, o que pode ter gerado resultados diferentes do esperado, e ser atribuído à dieta.

Na avaliação das proteínas totais, no grupo de coelhos machos houve aumento estatisticamente significativo na dose de 5 mg/kg; e diminuição estatisticamente significativa nas doses de 50 mg/kg, 300 mg/kg e 2000 mg/kg; sendo que o grupo controle e demais grupos experimentais se encontravam dentro da faixa de normalidade dos valores referenciais do laboratório onde foi processado o material.

As proteínas plasmáticas têm um papel fundamental na distribuição das substâncias exógenas no organismo, as principais são a albumina e outras proteínas

incluem as lipoproteínas circulantes; e as proteínas de membranas dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Ligando-se reversivelmente a estas, são capazes de liberar quantidades na corrente circulatória conforme a redução de substância livre ou competição por outra substância que tenha afinidade pelo mesmo tipo de proteína (STOCKHAM e SCOTT, 2011). A hipoproteinemia pode ser uma das causas de aumento de toxicidade de fármacos que tem alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas, sendo um ponto de observação importante no uso de análogos de fármacos antiarrítmicos 1B, como a mexiletina.

Na avaliação do ácido úrico, no grupo de coelhos fêmea, os resultados indicaram diminuição estatisticamente significativa nas doses de 5 mg/kg e 50 mg/kg; e no grupo de machos, os resultados indicaram diminuição estatisticamente significativa nas doses de 5 mg/kg e 50 mg/kg e aumento estatisticamente significativo nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg; sendo que todos os valores dos grupos experimentais, inclusive os grupos controle machos e fêmeas da espécie coelho se encontravam abaixo da faixa de normalidade dos valores referenciais do laboratório onde foi processado o material.

O ácido úrico é produto do metabolismo das purinas nos primatas e em alguns canídeos, representando o fim do metabolismo de compostos nitrogenados do organismo (STOCKHAM e SCOTT, 2011), e devido ao fato de todos os animais da espécie coelho apresentarem esses valores abaixo da faixa de normalidade dos valores referenciais do laboratório, não podemos com isso atribuir essa diminuição a um efeito ao uso da JME-173.

Na avaliação da fosfatase alcalina no grupo de coelhos fêmea, os resultados indicaram diminuição estatisticamente significativa nas doses de 5 mg/kg e 300 mg/kg; e de aumento estatisticamente significativo na dose de 2000 mg/kg; contudo o grupo controle e as doses 5 e 300 mg/kg se apresentaram dentro da faixa de variação utilizada pelo laboratório onde o material foi analisado; e no grupo dos coelhos macho, houve aumento estatisticamente significativo apenas na dose de 300 mg/kg.

O aumento da atividade osteoblástica causa elevações na atividade plasmática da enzima, além de patologias como hiperparatireoidismo e osteossarcoma, além dos processos de cicatrização óssea e de crescimento, que podem elevar a atividade da enzima em até 3 vezes (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Também é relatado na bula do medicamento Mexitil® (DEF, 2015), como efeito

observado na espécie de animais experimental o rato, o aumento da fosfatase alcalina.

Segundo Melo e colaboradores (2012), o fato de alguns parâmetros bioquímicos encontram-se alterados, possivelmente seja pela influência do tipo de anestesia utilizada (injetável *versus* inalatória) e pelo estresse muscular os quais os animais de laboratório são submetidos no momento da coleta sanguínea

A ingestão adequada de alimentos constitui um dos fatores mais importantes para o animal de laboratório, uma vez que oferece condições de atingir seu potencial genético, de crescimento, de reprodução, de longevidade e de resposta a estímulos experimentais (ANDRADE, 2006).

A maioria das rações comerciais para animais de laboratório não tem o balanceamento correto, com a quantidade de diversos nutrientes em excesso ou abaixo do preconizado para nutrição dessas espécies (COUTO, 2006; MOURA e MATTARAIA, 2009).

Dessa forma, os valores encontrados em alguns dos parâmetros analisados, nos grupos experimentais e nos grupos controle, encontraram-se dentro da faixa de normalidade entre as diretrizes e literatura nacional e internacional, reforça assim que a conclusão encontra-se embasada nas referências científicas sobre animais de laboratório, o que nos sugere que a JME-173 em seu estado puro de síntese, não possui ação tóxica que pudesse afetar a integridade dos animais testados.

Este resultado é importante, uma vez que a Organização Mundial da Saúde recomenda que para um medicamento chegar ao mercado é necessária uma relação maior que 30 entre a dose estimada e a dose letal. Um dos pontos importantes é que as alterações observadas em resposta à dose de 2000 mg/kg, por via oral, podem ser provavelmente devidas à grande quantidade de composto administrado.

Na avaliação do peso dos órgãos, alguns órgãos tiveram seus pesos absolutos e relativos com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, porém tais alterações não indicaram implicações clínicas, considerados eventos pontuais.

No grupo de coelhos machos não houve alteração estatisticamente significativas nos órgãos analisados, entre o grupo controle e os grupos experimentais. No grupo das fêmeas, o timo apresentou diminuição estatisticamente significativa na dose de 50 mg/kg em relação ao controle.

No grupo de ratos fêmea, o coração apresentou aumento estatisticamente significativo nas doses de 5 mg/kg e 300 mg/kg em relação ao controle. O baço também apresentou alteração, e neste órgão houve aumento estatisticamente significativo nas doses de 50 mg/kg e 300 mg/kg em relação ao controle. Porém no exame anatomopatológico macroscópico, não foi feita qualquer anotação sobre forma, cor, tamanho ou presença de lesões que pudesse evidenciar alterações de caráter toxicológico ou mesmo patologias.

Como os animais utilizados eram provenientes de colônias *outbred*, atribui-se os valores encontrados a este fato, já que não foram evidenciadas alterações associadas ao uso da molécula JME-173, que representasse significado toxicológico.

Durante o encaminhamento do presente trabalho, muitos debates acerca do uso do grupo controle ocorrem, de forma a dar mais credibilidade aos resultados obtidos, ainda que o CONCEA em sua RN Nº 18 de 24 de setembro de 2014, em seu Art.1º reconheça o uso de métodos alternativos validados, que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa, nos termos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008; cita o guia da OECD Nº 420 como um método alternativo, por reduzir o número de animais nos testes.

Tanto o guia da ANVISA como o da OECD não sugerem o uso de grupo controle. Novamente, foi aplicado o princípio da precaução e introduzido o grupo controle, fazendo assim uma comparação pontual sobre a toxicologia da molécula testada, fornecendo subsídios para sua classificação segundo GHS e indicando novos rumos para conclusão das pesquisas à cerca de candidatos a fármacos antiasmáticos. Foi de suma importância o uso do grupo controle, permitindo que fossem observadas algumas alterações de parâmetros que seriam tidos como fora do esperado, mas que no presente trabalho não foram considerados estatisticamente relevantes.



## 6 CONCLUSÃO

Na avaliação dos sinais clínicos, não foram observadas alterações relacionadas ao uso da molécula JME-173 durante o período do teste de toxicidade aguda oral.

Em nenhuma das concentrações avaliadas, houve indução de óbitos no período do teste, sugerindo não haver características tóxicas para a molécula JME-173.

Todos os animais ganharam peso e tiveram a ingestão alimentar de acordo com os dados fisiológicos esperados para as duas espécies animais estudadas, durante o período do teste de toxicidade aguda.

Na avaliação bioquímica e hematológica, alguns parâmetros se encontravam diferentes estatisticamente do controle, contudo apresentavam-se dentro da faixa de normalidade dos valores de referência dos laboratórios que fizeram a análise do material coletado. Os valores de hematócrito em coelhos machos nas doses de 300 e 2000 mg/kg estavam acima da faixa de variação laboratorial. Os leucócitos em coelhos fêmeas na dose de 5 mg/kg se encontrava acima da faixa de variação laboratorial. A proteína total em coelhos machos estava abaixo da faixa de variação laboratorial. O sódio em ratos machos na dose de 300 mg/kg estava acima da faixa de variação laboratorial porém o próprio grupo controle também o estava. A uréia em coelhos fêmea na dose de 2000 mg/kg estava acima da faixa de variação laboratorial. Alguns outros parâmetros também se apresentavam além de fora da faixa de normalidade dos valores de referência dos laboratórios, contudo nestes casos os controles também já se encontravam alterados, e dessa forma não é possível atribuir essas alterações somente ao uso da JME-173.

O exame anatomopatológico macroscópico não evidenciou alterações nos órgãos analisados, em nenhuma das doses testadas.

Os resultados encontrados no presente estudo indicam, até o momento, que a molécula JME-173 não causou óbito e não apresentou sinais de toxicidade oral aguda, sugerindo que possa ser classificada de acordo com a orientação GHS como categoria 5.

Para o suporte necessário à segurança do medicamento na etapa de ensaios clínicos, é de suma importância a continuidade da participação do INCQS na

complementação do teste de toxicidade aguda, através da análise histopatológica, e a continuidade dos demais testes não clínicos contemplados no Guia da ANVISA como o teste de genotoxicidade através do Ensaio Cometa; de acordo com a RDC Nº 123 da ANVISA para o cumprimento regulatório necessário até a etapa de ensaio clínico e sua futura comercialização, bem como auxiliar no controle de qualidade pós mercado de medicamentos com esse mesmo propósito.

## REFERÊNCIAS

ABIQ. Associação Brasileira da Indústria Química. Departamento de Assuntos Técnicos. **O que é o GHS? Sistema harmonizado globalmente para a classificação e rotulagem de produtos químicos**. São Paulo: ABIQUIM/DETEC, 2005. 69 p. Disponível em <[http://abiquim.org.br/pdfs/manual\\_ghs.pdf](http://abiquim.org.br/pdfs/manual_ghs.pdf)>. Acesso em 01 jun. 2015.

ALVES, C.; ROBAZZI, T.C.; MENDONÇA, M. **Retirada da corticoterapia: recomendações para a prática clínica**. J. Pediatr., Porto Alegre, v.84, n.3, p. 192-202, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jped/v84n3/v84n3a03.pdf>>. Acesso em 20 mar. 2016.

AMARAL, L.M.; PALMA, P.V.; LEITE, I.C.G. **Evolução das políticas públicas e programas de controle da asma no Brasil sob a perspectiva dos consensos**. J. Bras Pneumol. 2012; 38(4): 518-525. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v38n4/v38n4a15.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2014.

ANDRADE A. Bioterismo: evolução e importância. In: ANDRADE A, PINTO SC, OLIVEIRA RS (Org). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006. 387 p.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficiência Brasília, 31 de Janeiro de 2013 versão 2. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/>> Acesso em: 11 out. 2014.

ANVISA – **Resolução de Diretoria Colegiada RDC Nº136 de 23 de maio de 2003**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Pos++Comercializacao++Pos++Uso/Farmacovigilancia/Assunto+de+Interesse/LegislacaoLegislation/20030529+136>>. Acesso em 01 jun. 2014

BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders**: Clínica de Pequenos Animais. São Paulo. Ed. Roca, 1998. 2072 p.

BRASIL, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do §1º do art.225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm)>. Acesso em: 28 mar. 2014.

BRASIL. Conselho Nacional de Experimentação Animal - CONCEA Resolução Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução

Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. Disponível em: <[http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0234/234796.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0234/234796.pdf)>. Acesso em: 01 de Out. 2015. BRASIL. Conselho Nacional de Experimentação Animal - CONCEA Resolução Normativa Nº 30, de 02 de fevereiro de 2016 que revoga a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. Resolução Normativa nº 12, de 20 de setembro de 2013. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/364432.html>>. Acesso em: 02 abr. 2016.

CAMPOS, H.S. **Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteroide**. Revista Brasileira de Pneumologia Sanitária. 2007; 15(1): 4760. Disponível em: <<http://www.arca.fiocruz.br/xmlui/bitstream/handle/icict/10776/Asma%20suas%20origens,%20seus%20mecanismos%20inflamato%C3%B3rios%20e%20o%20papel%20do%20corticoster%C3%B3ide%20..pdf?sequence=2>>. Acesso em 23 de set. 2014.

CAMPOS, H.S.; CAMARGOS, P.A.M. **Broncodilatadores**. Pulmão RJ 2012; 21 (2): 60-64. Disponível em: <[http://www.sopterj.com.br/profissionais/\\_revista/2012/n\\_02/10.pdf](http://www.sopterj.com.br/profissionais/_revista/2012/n_02/10.pdf)>. Acesso em: 23 jan. 2016.

CAMPANHA, S. M. A; FREIRE, L.M.S.; FONTE S, M.J.F. **O impacto da asma, da rinite alérgica e da respiração oral na qualidade de vida de crianças e adolescentes**. Revista CEFAC, São Paulo, v.10, n.4, 513-519, out-dez, 2008.

COHEN, S.G. **Asthma in Antiquity: The Ebers Papyrus**. Allergy Proc. May-June 1992, Vol.13, Nº3. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/ocean/aap/1992/00000013/00000003/art00008?crawler=true&mimetype=application/pdf>> .Acesso em: 15out. 2015.

COSTA, J.C.S. **Síntese e avaliação da atividade anti-inflamatória e espasmolítica de análogos de lidocaína**. 2005. 269p. Tese (doutorado em Biologia Celular e Molecular) Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

COUTO, S.E.R. Equipamentos, Materiais e Insumos. In: ANDRADE A, PINTO SC, OLIVEIRA RS (Org). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006. 387 p

CHOBY, G.W.; LEE, S. **Pharmacotherapy for the treatment of asthma: current treatment option sand future directions**. Int Forum Allergy Rhinol. 2015; 5:S35-S40. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/alr.21592/pdf>>. Acesso em 13 jan. 2016.

DAMASCENO, E.; COSTA-CARVALHO, B.T.; SOLÉ, D.; WANDALSEN, G.F. **Direct and indirect costs of asthma: a review**. Revista Brasileira de Alergia e Imunologia. São Paulo, vol 35, Nº6, 2012. Disponível em: <<http://www.bjai.org.br/>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS - DATASUS. 2016. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>> Acesso em: 05 jan. 2016.

Dicionário de especialidades farmacêuticas: **DEF 2015**. 43. ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2015. 768 p.

EBSUI, L.; FONTES, R.S.; LAPICHIK, V.B.V. Rato. In: LAPCHIK, V.V; MATTARAIA, V.M.; KO, G.M (Org.). **Cuidado e manejo de animais de laboratório**. 1ª edição. Ed. Atheneu, São Paulo, 2009. 708 p.

ESMERALDINO, A.T.; FALLAVENA, L.C.B.; RODRIGUES, N.C.; AVILA, V.P.F. **Necropsia de cães - Descrição da técnica através de imagem**. Editora Ulbra. Canoas, RS. 2008. 80 p.

FAOUD, T.I. **The inflammatory response in the pathogenesis of asthma**. The Journal of the American Osteopathic Association, November 2011, Vol. 111, S11-S17. Disponível em: <<http://jaoa.org/article.aspx?articleid=2094079>>. Acesso em: 23 out. 2015.

FERNÁNDEZ, A.T. **Termoplastia bronquial e el tratamiento de el asma**. Arch Bronconeumol. 2010; 46(2): 8591. Disponível em: <<http://www.archbronconeumol.org>>. Acesso em 01 dez. 2015.

FIOCRUZ. Instituto Oswaldo Cruz. Jorge Costa; Marco Aurélio Martins. Molécula JME. BR n. P 1812, 05 nov. 2013.

FIOCRUZ. Vice - Presidência de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. **Manual de Utilização de Animais**. Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação – CEUA. Primeira Edição. 2008.

FRAJBLAT, M.; AMARAL, V. L. L.; RIVERA, E. A. B.. **Ciência em animais de laboratório**. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 60, n. 2, 2008. Disponível em: <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252008000200019&script=sci\\_arttext](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252008000200019&script=sci_arttext)>. Acesso em: 16 dez. 2015.

GAHART, B.L. et al. **Medicamentos Intravenosos**. 26ª edição. Rio de Janeiro. Ed. Elsevier. 2011.

GAZZOTTI, M.R.; et al. **Level of asthma control and its impact on activities of daily living in asthma patients in Brazil**. J Bras Pneumol. 2013 Sep-Oct; 39 (5): 532538. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4075876/>>. Acesso em: 01 de ago. de 2015.

GELLER, M.; SCHEINBER, M. **Diagnóstico e tratamento de doenças imunológicas**. Editora Elsevier. Rio de Janeiro. 2015. 446 p.

GENOV et al. **Asma e genes. Conceitos preliminares**. Rev. Bras. Alerg. Imunopatol. Vol. 29, Nº 4, 2006. Disponível em: <[http://www.sbai.org.br/revistas/vol294/asma\\_genes.pdf](http://www.sbai.org.br/revistas/vol294/asma_genes.pdf)>. Acesso em: 08 jan. 2016.

Global Initiative for Asthma - GINA. **Diretrizes para o manejo da asma 2014**

Disponível em:

<[http://ginasthma.org/local/uploads/files/GINA\\_Pocket\\_Portuguese2014.pdf](http://ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Pocket_Portuguese2014.pdf)>.

Acesso em: 01 out. 2015.

GUALDI, L.P.; et al. **Modelos murinos para pesquisa sem asma**. Scientia Medica Porto Alegre. 2010; volume 20, número 3, p.236-242.

GOLDIN, J.R. **A avaliação da investigação científica de novas drogas: a importância da caracterização adequada das fases da pesquisa**. Revista. HCPA 2007; (1)

GONÇALVES, N.Z. **Avaliação da toxicidade oral aguda e atividade diurética de Celtisiguanaea (Jacq.) Sargent**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde–Farmácia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. 1821p.

HOLTZMAN, M.J. **Asthma as a chronic disease of the innate and adaptive immune systems responding to viruses and allergens**. The Journal of Clinical Investigation Number 8 August 2012. Disponível em: "<http://www.jci.org/articles/view/60325/version/1/pdf/render>"<http://www.jci.org/articles/view/60325/version/1/pdf/render>. Acesso em: 12 fev. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. POP 65.3300.005: **Determinação de peso corporal de animais de laboratório**. rev. 05. Rio de Janeiro, 2013. 06p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. POP 65.3340.00 **Boas práticas em experimentação animal**. Rev. 10. Rio de Janeiro, 2013. 13p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

KO, G.M.; MATTARAIA, V.G.M. Alimentação e Hidratação. In: LAPCHIK, V.V; MATTARAIA, V.M.; KO, G.M (Org.). **Cuidado e manejo de animais de laboratório**. 1ª edição. Ed. Atheneu, São Paulo, 2009. 708 p.

KUDO, M.; ISHIGATSUBO, I.; AOK, I.. **Pathology of asthma**. Frontier sin Microbiology. 2013; 4: 263. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768124/>>. Acesso em: 14 fev. 2016.

LEITE, M. PONTE, E.V. PETRONI, J.A. PIZZICHINI, E. CRUZ, A. **Avaliação do questionário de controle da asma validado para uso no Brasil**. J. Bras. Pneumol. 2008, 34 (10). 756-763. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v34n10/v34n10a02.pdf>>. Acesso em: 21 jan 2016.

MAUAD, T.P.H.N. DOLHNIKOFF. FERREIRA, D.S. SIMÕES, S.M. SOUZA-MACHADO, A. **Imunopatologia e Remodelamento brônquico na asma**. Gazeta Médica da Bahia 2008; 78 (Suplemento 2): 75-85. Disponível em:<

<<http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/753/736>>. Acesso em: 14 jun. 2015.

MARTINEZ, F.D. VENCELLI, D. **Asthma**. The Lancet. Vol 382, nº 9901, p.1360-72, 19 October 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61536-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61536-6)>. Acesso em: 23 ago. 2015.

MELO, M.G. et al. **Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (Rattus norvegicus) linhagem Wistar provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe**. Scientia Plena 8, 049903 (2012). Disponível em: <<http://www.scientiaplena.org.br/sp/article/viewFile/1784/948>>. Acesso em: 16 dez. 2015

Ministério da Saúde do Brasil. **Normas e Manuais Técnicos. Caderno de Atenção Básica nº25: Doenças Respiratórias Crônicas**. Brasília 2010. Disponível em: <[http://www.bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas\\_respiratorias\\_cronicas.pdf](http://www.bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_respiratorias_cronicas.pdf)>. Acesso em: 14 out. 2014.

MOURA, A.S.A.M.T.; MATTARAIA, V.G.M. Coelho. In: LAPCHIK, V.V; MATTARAIA, V.M.; KO, G.M (org.). **Cuidado e manejo de animais de laboratório**. 1ª edição. Ed. Atheneu, São Paulo, 2009. 708 p.

NANZER, A.M.; MENZIES-GOW, A. **Defining severe asthma-an approach to find new therapies**. European Clinical Respiratory Journal. Vol. 1. 2014. Disponível <<http://www.ecrj.net/index.php/ecrj/article/view/24356>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

NETO, A.C (Org.). **Asma em Saúde Pública**. Editora Manole. Baurer. S.P. 2007. 299 p.

OLSEN, P.C. **Estudo do mecanismo de ação anti-inflamatório do análogo de lidocaína JMF2-1 e sua pontencial aplicabilidade no controle da asma**. 2011. 176 p. Tese (doutorado em Biologia Celular e Molecular) Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

OLSEN, P.C. MARTINS, M.A. **Medicação anti-inflamatória alternativa aos glicocorticoides para o tratamento da asma: papel dos modificadores de leucotrienos, estabilizadores de mastócitos e outras perspectivas**. Pulmão RJ 2012; 21 (2): 65-69. Disponível em <[http://www.sopterj.com.br/profissionais/\\_revista/2012/n\\_02/11.pdf](http://www.sopterj.com.br/profissionais/_revista/2012/n_02/11.pdf)>. Acesso em: 15 dez. 2015.

Organisation for Economic Co-operation and Development – OECD. <[http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd\\_gl423.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf)> Acesso em: 01 jun.2014.

RIVERA, E.A.B, Estresse em animais de laboratório. In: ANDRADE A, PINTO SC, OLIVEIRA RS (Org). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006. 387 p

- ROCCO, P.R.M.; et al, **LASS Bio-596: da descoberta aos ensaios pré-clínicos**. Revista Virtual de Química. 2010, 2 (1), 10-27. Disponível em: <<http://rvq.sbgq.org.br/index.php/rvq/article/view/74/118>>. Acesso em: 24 jul 2014.
- RODRIGUES, F.Z. **Panorama atual da asma: epidemiologia, fisiopatologia e tratamentos**. Trabalho apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso do Curso De Farmácia/FMU. São Paulo. 2007. Disponível em: <<http://arquivo.fmu.br/prodisc/farmacia/fzr.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2015.
- ROENN, J.H.V. PAIVE, J.A. PREODOR, M.E. **Current Diagnosis and treatment of pain**. AMGH Editora LTDA. Porto Alegre, 2011. 364 p.
- RUBIN, A.S.; CARDOSO P.F.G. **Termoplastia brônquica em asma**. J. Bras. Pneumol. 2010; 36. Disponível em: <[http://www.jornaldepneumologia.com.br/detalhe\\_artigo.asp?id=901](http://www.jornaldepneumologia.com.br/detalhe_artigo.asp?id=901)>. Acesso em: 01 jan. 2016.
- SANTOS, L.A.; et al. **Direct costs of asthma in Brazil: a comparison between controled and uncontrolled asthmatic patients**. Braz J. Med Biol Res 40: 943-948, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2007000700008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2007000700008)>. Acesso em: 18 mai. 2015.
- SANTOS T. **Teste toxicológico pré-clínico para o desenvolvimento da vacina anti-helmíntica baseada no antígeno r-sm14 de *Schistosoma mansoni***. 2012. 143 p. Dissertação (mestrado em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2012.
- SERRA, M.F.S. et al. **Nebulized Lidocaine Prevents Airway Inflammation, Peribronchial Fibrosis, and Mucus Production in a Murine Model of Asthma**. Anesthesiology. 2012 Sep; 117(3): 580-91. Disponível em: <<http://anesthesiology.pubs.asahq.org/article.aspx?articleid=1933966&resultClick=3>>. Acesso em: 07 jan. 2016.
- SILVA, E.C.F. **Asma Brônquica**. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto. 2008; 7 (2): 33-57. Disponível em: <[http://revista.hupe.uerj.br/detalhe\\_artigo.asp?id=202](http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=202)>. Acesso em 23 ago. 2015.
- SILVA, E.C.F. DIAS G.A.C. **Patogenia da asma**. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto. 2013; 12 (2): 31-40 <[http://revista.hupe.uerj.br/detalhe\\_artigo.asp?id=391](http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=391)>. Acesso em: 27 nov. 2015.
- SILVA, L.C.C; HETZEL, J.L. **Pneumologia: Princípios e Prática**. Ed. Artmed. Porto Alegre. 2011. 1002 p.
- Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia – SBPT. **IV Diretrizes para o Manejo da Asma**. Disponível em: <[http://www.sbpt.org.br/ASMA/SBPT\\_DIRETRIZES\\_MANEJO\\_ASMA\\_SBPT\\_2012.pdf](http://www.sbpt.org.br/ASMA/SBPT_DIRETRIZES_MANEJO_ASMA_SBPT_2012.pdf)>. Acesso em: 17 mai. 2014.
- STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan. 2012. 744 p.



VALADARES, M.C. **Avaliação de Toxicidade Aguda: Estratégias após a Era do Teste DL 50**. Revista Eletrônica de Farmácia Vol3 (2),93-98, 2006. Disponível em: <<http://www.usp.br/bioterio/Artigos/Procedimentos%20experimentais/Alternativa.pdf>> Acesso em: 03 jan. 2015.

VIEIRA, F.P.V; REDIGUIERI, C.F.; REDIGUIERI, C.F. **A regulamentação de medicamentos no Brasil**. Ed. Artmed. Porto Alegre. 2013. 671 p.

TORRES R.C. et al. **Mecanismos celulares e moleculares da ação anti-inflamatória dos glicocorticoides**. Cospus et Scientia. Rio de Janeiro v.8, n2, p.36-51, out. 2012. Disponível em: <<http://apl.unisuam.edu.br/revistas/index.php/corpusetscientia/article/view/25/22>>. Acesso em: 04 de dez. 2015.

YUN,J. et al. **Comparative toxicity of silicon dioxide, silver and iron oxide nanoparticles after repeated oral administration to rats**. J. of Appl. Toxicol. 2015; 35:681693. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jat.3125/abstract;jsessionid=9AF7C6C797AC80CA79680A9585A60DEC.f01t04>>. Acesso em: 04 mai. 2015.

**ANEXO 01:** Classificação da gravidade da asma, de acordo com a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.

	<b>Intermitente*</b>	<b>leve</b>	<b>Persistente moderada</b>	<b>grave</b>
Sintomas	Raros	Semanais	Diários	Diários ou contínuos
Despertares noturnos	Raros	Mensais	Semanais	Quase diários
Necessidade de beta-2 para alívio	Rara	Eventual	Diária	Diária
Limitação de atividades	Nenhuma	Presente nas exacerbações	Presente nas exacerbações	Contínua
Exacerbações	Raras	Afeta atividades e o sono	Afeta atividades e o sono	Freqüentes
VEF <sub>1</sub> ou PFE	≥ 80% predito	≥ 80% predito	60-80% predito	≤ 60% predito
Variação VEF <sub>1</sub> ou PFE	< 20%	< 20-30%	> 30%	> 30%

Classificar o paciente sempre pela manifestação de maior gravidade.

\*Pacientes com asma intermitente, mas com exacerbações graves, devem ser classificados como tendo asma persistente moderada.

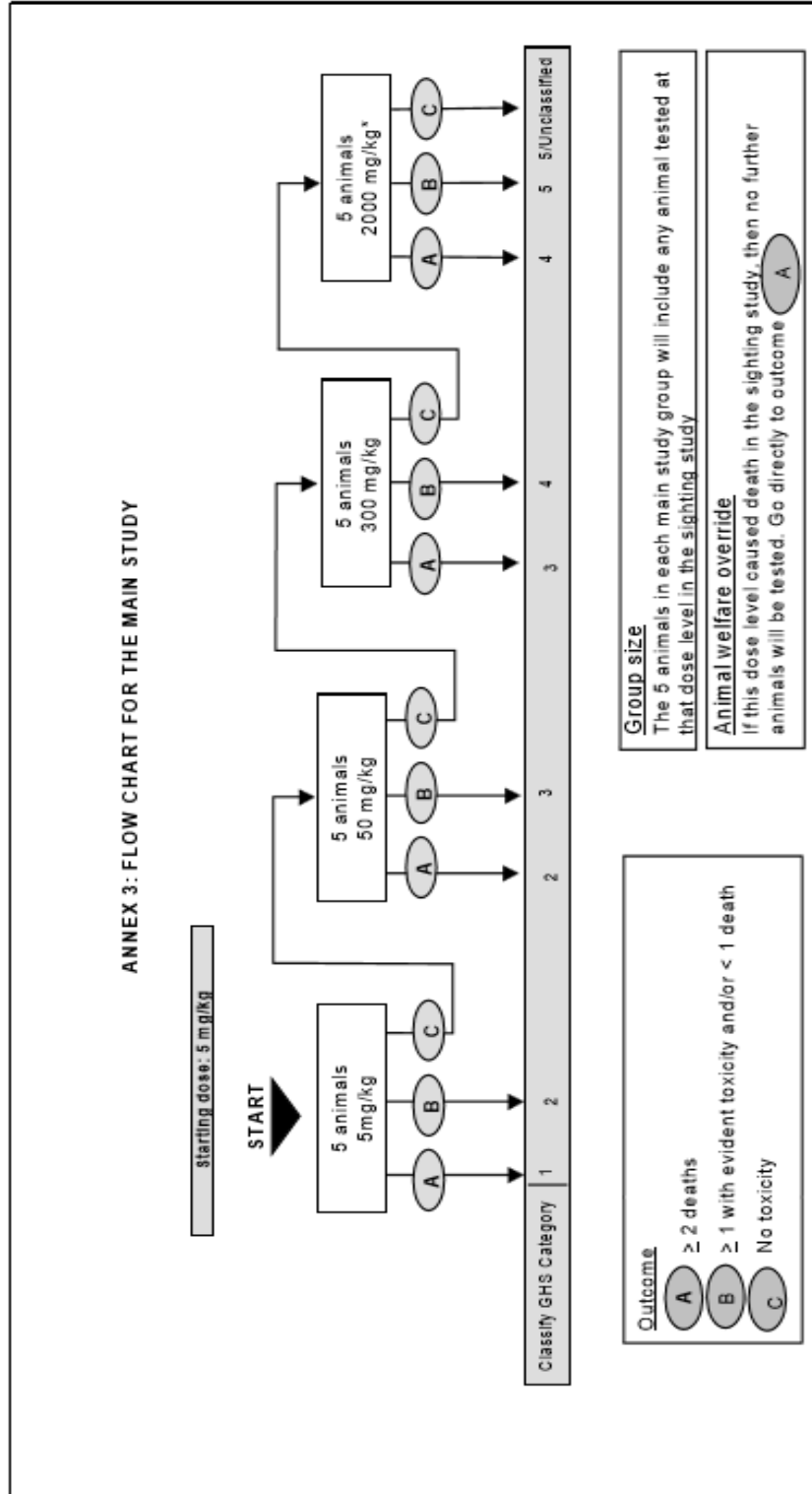
VEF<sub>1</sub>: volume expiratório forçado no primeiro segundo; PFE: pico de fluxo expiratório.

Fonte: Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, IV Diretrizes para o Manejo da Asma (2012).

**ANEXO 02: FLUXOGRAMA PARA A CONDUÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA, DE ACORDO COM O GUIA DA OECD Nº 420.**

420

OECD/OCDE



**ANEXO 03: CERTIFICADO LICENÇA CEUA - FIOCRUZ**

MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
 VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO  
 Comissão de Ética no Uso de Animais  
 CEUA-FIOCRUZ

**CERTIFICADO**

**C**ertificamos que o protocolo intitulado :

" *Controle toxico-farmacológico de produtos sob a ação da vigilância sanitária.* "

número P-137/02, proposto por Fernando Faria Fingola, foi licenciado pelo  
 Nº L-010/05.

Sua licença de Nº L-010/05 autoriza o uso anual de :

- 1578 *Oryctolagus cuniculus*
- 10550 *Mus musculus*
- 2680 *Cavia porcellus*
- 145 *Rattus norvegicus*
- 40 *Mesocricetus auratus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal ( COBEA ) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ( CEUA - FIOCRUZ ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 26 de abril de 2016 .

Rio de Janeiro, 25/09/2008

Dra. Norma Vollmer Labarthe  
 Coordenadora da CEUA  
 FIOCRUZ

**ANEXO 04: TABELA ELABORADA PARA AVALIAÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS.****AVALIAÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS – JME 173**

Espécie: \_\_\_\_\_ Grupo: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_ Dia OBS: \_\_\_\_\_

<b>Animais</b>	<b>Exploração</b>	<b>Frêmito vocal</b>	<b>Resposta ao toque</b>	<b>Pinçamento caudal</b>	<b>Ataxia</b>	<b>Reflexo endireitam.</b>	<b>Reflexo auricular</b>	<b>Reflexo córneo</b>	<b>Straub</b>	<b>Piloereção</b>	<b>Dacriorréia</b>	<b>Sialorréia</b>	<b>Ptoses</b>	<b>Micção</b>	<b>Defecação</b>
<b>Nº 01</b>															
<b>Nº 02</b>															
<b>Nº 03</b>															
<b>Nº 04</b>															
<b>Nº 05</b>															

Legenda: S – Sim; N – Não.

OBS: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Fonte: o próprio autor (em escala reduzida).2014.