UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo da correlação dose/concentração plasmática e de alterações
bioquímicas, hematológicas, hemostáticas e histopatológicas induzidas pela
rifampicina, ofloxacina e minociclina, em ratos Wistar**

Wilson Roberto Malfará

**Ribeirão Preto
2005**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo da correlação dose/concentração plasmática e de alterações
bioquímicas, hematológicas, hemostáticas e histopatológicas induzidas pela
rifampicina, ofloxacina e minociclina, em ratos Wistar**

Wilson Roberto Malfará

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do
título de Doutor em Toxicologia, Área de
concentração: Toxicologia.**

Orientadora: Profa.Dra. Regina Helena Costa Queiroz

**Ribeirão Preto
2005**

Wilson Roberto Malfará

Estudo da correlação dose/concentração plasmática e de alterações bioquímicas, hematológicas, hemostáticas e histopatológicas induzidas pela rifampicina, ofloxacina e minociclina, em ratos Wistar

Prof(a) Dr(a) Regina Helena Costa Queiroz (orientadora)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Prof. Dra. Ana Maria de Souza

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Prof. Dr. Ruberval Armando Lopes

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP

Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araquara- UNESP

Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em 06/04/2005

A Deus

*...Por mais uma oportunidade de
crescimento, pela vida, pelo seu amparo,
auxílio e amor incondicionais em todos os
momentos... minha eterna gratidão*

Senhor ensina-nos:

*A orar sem esquecer o trabalho;
A dar sem olhar a quem;
A servir sem perguntar até quando;
A sofrer sem magoar seja a quem for;
A progredir sem perder a simplicidade;
A semear o bem sem pensar nos resultados;
A desculpar sem condições;
A marchar para a frente sem contar os obstáculos;
A ver sem malícia;
A escutar sem corromper os assuntos;
A falar sem ferir;
A compreender o próximo sem exigir entendimento;
A respeitar os semelhantes sem reclamar consideração;
A dar o melhor de nós, além da execução do próprio dever,
sem cobrar taxas de reconhecimento;
Senhor fortalece em nós a paciência para com as dificuldades dos
outros,
Assim como precisamos da paciência dos outros para com as nossas;
Ajuda-nos, sobretudo, a reconhecer que a nossa felicidade mais alta
será invariavelmente, aquela de cumprir-Te os desígnios onde e como
queiras, hoje, agora e sempre.*

Emmanuel / Chico Xavier

*Aos meus pais Geraldo e Odila
por tanto amor e compreensão em
todos os momentos de minha vida, por
entenderem todos os meus “nãos e os depois”...
Peço perdão pelo momentos que deles roubei ...*

*À D. Anna Barreto (in memoriam), por me
proporcionar o privilégio de senti-la
sempre ao meu lado ...
pelo seu amor incondicional ...*

*À Marli Barreto por me acolher
com tanta paciência e amor e por
participar ativamente de mais um
objetivo ...minha gratidão*

*À minha orientadora Profa.Dra. Regina Helena por
confiar , acreditar e apoiar sempre o meu trabalho,
por me transmitir tantos ensinamentos...pela sua
sua competência , sabedoria e humildade*

*Ao meu irmão Mauro, minha cunhada Tê, aos meus
sobrinhos Na, Jú e Bi, à Cleide e Ágatha
por serem responsáveis diretos por momentos inesquecíveis
e por me proporcionar tantas alegrias ..*

*À Márcia pela sua paciência e compreensão,
pelos seus olhos me dizerem tanta coisa ...
por simplesmente estar presente ...*

Aos Profs. Dr. Antonio Cardozo doa Santos e Dra. Ana Maria de Souza pela preciosa colaboração no trabalho e na banca de qualificação.

Aos Profs. Dr. Sérgio Akira Uyemura pelo apoio nas análises bioquímicas e ao Dr. Ruberval Armando Lopes por possibilitar a viabilidade dos estudos histopatológicos.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi e ao Prof. Dr. José Aparecido da Silva pela amizade e apoio tão fundamentais.

Aos Profs. Dr. Edson Z. Martinez e Alexandre Souto Martinez pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos Sonia, Cidinha, Neife, Natalino e Eduardo pela ajuda constante, competência e pela paciência....e pela amizade conquistada....

Aos funcionários e amigos do laboratório de histopatologia Antonio, Edna, Gilberto e Adriana pela paciência constante e por tanto carinho...

À Sandra e a Lúcia, secretárias de Departamento pelo auxílio em momentos de apuros e pela amizade.

Aos meus grandes amigos Adriano e Élen e a toda família Araujo...quanta gratidão e amor ...

Aos meus ex-professores mestres Adalberto de Oliveira Gonçalves e Luiz Taneo Shimano pelo nosso relacionamento ir além da amizade, pelo incentivo e apoio contantes que me direcionaram e pelas oportunidades de crescimento ...

Aos funcionários do biotério Aldo, Reinaldo e Ronaldo pela paciência e carinho e pela cooperação com os animais.

Aos amigos: Paulo, Paula, Adriana, Maria Paula, Vanessa, Caju, Flávio, Maurício, Tiago e Ana, Marina, Marcos de Cássio Ferreira, Daniel pelo apoio e companherismo.

Às funcionárias da seção de pós-graduação Ana, Rosana e Eleni pela paciência e por tanta dedicação.

A todos os Professores e Funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por terem me acolhido tão bem, pelo carinho, amizade e respeito...minha gratidão.

A todos que não foram citados que de uma maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

À Capes pelo apoio financeiro durante a execução do trabalho.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e/ou siglas	iii
Lista de tabelas	v
Lista de figuras	vii
Resumo	x
Summary	xi
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Farmacocinética – Generalidades	13
1.2 Procedimentos laboratoriais	22
1.3 Métodos cromatográficos	29
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Material	35
3.2 Métodos	39
4. RESULTADOS	61
4.1 Padronização e validação dos métodos por CLAE	61
4.1.1 Análise da rifampicina em plasma de ratos por CLAE	61
4.1.2 Análise simultânea da ofloxacina e minociclina em plasma de ratos por CLAE	66
4.2 Análise da relação dose / concentração plasmática em esquema de dose única	72
4.3 Análise da relação dose / concentração plasmática em esquema de dose múltipla	77
4.4 Análise dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e hemostáticos em esquema de dose única	79
4.5 Análise dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e hemostáticos em esquema de dose múltipla	118

4.6	Reultados morfológicos	139
4.6.1	Histopatologia	139
4.7	Resultados morfométricos	154
4.7.1	Cariometria dos hepatócitos dose única.....	154
4.7.2	Cariometria dos hepatócitos dose múltipla	164
4.8	Resultados estereológicos	167
4.8.1	Estereologia dos hepatócitos dose única	167
4.8.2	Estereologia dos hepatócitos dose múltipla	173
5.	DISCUSSÃO	176
6.	CONCLUSÕES	192
	REFERÊNCIAS	195

Anexo

FICHA CATALOGRÁFICA

Malfará, Wilson Roberto

Estudo da correlação dose/concentração plasmática e de alterações bioquímicas, hematológicas, hemostáticas e histopatológicas induzidas pela rifampicina, ofloxacina e minociclina, em ratos Wistar. Ribeirão Preto, 2005.

209 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Queiroz, Regina Helena Costa.

1. Esquema ROM. 2. Rifampicina. 3. Concentração plasmática.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ALFAC	Álcool+formol+ácido acético
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
BD	Bilirrubina direta
BT	Bilirrubina total
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coefficiente de variação
CYP	Citocromo P₄₅₀
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido tetracético d-etilenodiamino
GGT	Gama-glutamyltransferase
GLY-P	Glicoproteína P
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HPLC	High performance liquid chromatograph
Ht	Hematócrito
i.p.	Intraperitoneal
LDH	Lactato desidrogenase
LQ	Limite de quantificação
MDH	Malato desidrogenase
MINO	Minociclina
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo – oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo – reduzida
OFLX	Ofloxacina
PB	Paucibacilares
PQT	Poliquimioterapia
PT	Proteínas totais

RFP	Rifampicina
ROM	Rifampicina+ofloxacina+minociclina
TP	Tempo de protrombina
tR	Tempo de retenção
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativado
U.V.	Ultravioleta
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Precisão e exatidão da análise da rifampicina em plasma de ratos por CLAE.....	63
Tabela 2-	Recuperação da análise da rifampicina em plasma de ratos por CLAE	63
Tabela 3-	Precisão e exatidão da análise da rifampicina em plasma de ratos por CLAE	64
Tabela 4-	Especificidade da análise da rifampicina em plasma de ratos por CLAE ..	65
Tabela 5-	Precisão e exatidão da análise da ofloxacin e minociclina em plasma de ratos por CLAE	68
Tabela 6-	Recuperação da análise da ofloxacin e minociclina em plasma de ratos por CLAE	69
Tabela 7-	Precisão e exatidão do LQ da análise da ofloxacin e minociclina em plasma de ratos por CLAE	69
Tabela 8-	Especificidade da análise da ofloxacin e minociclina m plasma de ratos por CLAE	70
Tabela 9-	Concentrações plasmáticas da rifampicina isolada e associada em esquema de dose única	73
Tabela 10-	Concentrações plasmáticas da ofloxacin isolada e associada em esquema de dose única	75
Tabela 11-	Concentrações plasmáticas da minociclina isolada e associada em esquema de dose única.....	76
Tabela 12-	Concentrações plasmáticas da rifampicina, ofloxacin e minociclina isoladas e associadas em esquema de doses múltiplas	78
Tabela 13-	Cariometria de animais controle e tratados com rifampicina em esquema de dose única	157
Tabela 14-	Cariometria de animais controle e tratados com ofloxacin em esquema de dose única	158
Tabela 15-	Cariometria de animais controle e tratados com minociclina em esquema de dose única	159
Tabela16-	Cariometria de animais controle e tratados com ROM em esquema de dose única	160
Tabela 17-	Cariometria de animais tratados com RFP50, OFLX40 e MINO10 isolados e associados em esquema de dose única	161

Tabela 18-	Cariometria de animais tratados com RFP100, OFLX80 e MINO20 isolados e associados em esquema de dose única	162
Tabela 19-	Cariometria de animais tratados com RFP200, OFLX160 e MINO40 isolados e associados em esquema de dose única	163
Tabela 20-	Cariometria de animais controle e tratados com RFP100, OFLX80 e MINO20 isolados e associados em esquema de dose múltipla.....	165
Tabela 21-	Cariometria de animais tratados com RFP100, OFLX80 e MINO20 isolados e associados em esquema de dose múltipla.....	166
Tabela 22-	Estereologia de animais controle e tratados com rifampicina em esquema de dose única	168
Tabela 23-	Estereologia de animais controle e tratados com ofloxacina em esquema de dose única	168
Tabela 24-	Estereologia de animais controle e tratados com minociclina em esquema de dose única	169
Tabela 25-	Estereologia de animais controle e tratados com ROM em esquema de dose única	169
Tabela 26-	Estereologia de animais tratados com RFP50, OFLX40 e MINO10 isolados e associados em esquema de dose única	171
Tabela 27-	Estereologia de animais tratados com RFP100, OFLX80 e MINO20 isolados e associados em esquema de dose única	171
Tabela 28-	Esterologia de animais tratados com RFP200, OFLX160 e MINO40 isolados e associados em esquema de dose única	172
Tabela 29-	Estereologia de animais controle e tratados com RFP100, OFLX80 e MINO20 isolados e associados em esquema de dose múltipla.....	174
Tabela 30-	Estereologia de animais tratados com RFP100, OFLX80 e MINO20 isolados e associados em esquema de dose múltipla.....	174

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Distribuição da hanseníase no Brasil	5
Figura 2-	Coeficiente de prevalência da hanseníase no Brasil	5
Figura 3-	Casos novos de hanseníase no Brasil	6
Figura 4-	Prevalência da hanseníase no Brasil por região	6
Figura 5-	Procedimento de extração da rifampicina em plasma de ratos	41
Figura 6-	Procedimento de extração da ofloxacina e minociclina em plasma de ratos	44
Figura 7-	Representação da grade de Merz	56
Figura 8-	Cromatogramas referentes a análise de rifampicina	61
Figura 9A-	Curva de calibração da rifampicina	62
Figura 9B-	Curva de linearidade da rifampicina	62
Figura 10-	Coeficiente de correlação linear da curva da rifampicina	64
Figura 11-	Cromatogramas referentes a análise de ofloxacina e minociclina	66
Figura 12A-	Curva de calibração da ofloxacina e minociclina	67
Figura 12B-	Curva de linearidade da ofloxacina e minociclina	67
Figura 13-	Coeficiente de correlação linear da ofloxacina e minociclina	70
Figura 14-	Concentrações plasmáticas da rifampicina isolada e associada em esquema de dose única	73
Figura 15-	Concentrações plasmáticas da ofloxacina isolada e associada em esquema de dose única	75
Figura 16-	Concentrações plasmáticas da minociclina isolada e associada em esquema de dose única	76
Figura 17-	Concentrações plasmáticas da RFP100, OFLX80 e MINO20 isoladas e associadas em esquema de dose múltipla	78
Figura 18-	Parâmetro ALT em esquema de dose única	81
Figura 19-	Parâmetro AST em esquema de dose única	82
Figura 20-	Parâmetro ALP em esquema de dose única	84
Figura 21-	Parâmetro GGT em esquema de dose única	85
Figura 22-	Parâmetro PT em esquema de dose única	87
Figura 23-	Parâmetro albumina em esquema de dose única	88
Figura 24-	Parâmetro BT em esquema de dose única	90
Figura 25-	Parâmetro BD em esquema de dose única	91

Figura 26-	Parâmetro uréia em esquema de dose única	93
Figura 27-	Parâmetro creatinina em esquema de dose única	94
Figura 28-	Parâmetro amilase em esquema de dose única	96
Figura 29-	Parâmetro hematócrito em esquema de dose única	98
Figura 30-	Parâmetro eritrócitos em esquema de dose única	99
Figura 31-	Parâmetro hemoglobina em esquema de dose única	101
Figura 32-	Parâmetro VCM em esquema de dose única	102
Figura 33-	Parâmetro HCM em esquema de dose única	104
Figura 34-	Parâmetro CHCM em esquema de dose única	105
Figura 35-	Parâmetro leucócitos em esquema de dose única	107
Figura 36-	Parâmetro linfócitos em esquema de dose única	108
Figura 37-	Parâmetro eosinófilos em esquema de dose única	110
Figura 38-	Parâmetro monócitos em esquema de dose única	111
Figura 39-	Parâmetro bastonetes em esquema de dose única	113
Figura 40-	Parâmetro segmentados em esquema de dose única	114
Figura 41-	Parâmetro TP em esquema de dose única	116
Figura 42-	Parâmetro TTPA em esquema de dose única	117
Figura 43-	Parâmetro ALT em esquema de dose múltipla	119
Figura 44-	Parâmetro AST em esquema de dose múltipla	119
Figura 45-	Parâmetro ALP em esquema de dose múltipla	121
Figura 46-	Parâmetro GGT em esquema de dose múltipla	121
Figura 47-	Parâmetro PT em esquema de dose múltipla	123
Figura 48-	Parâmetro albumina em esquema de dose múltipla	123
Figura 49-	Parâmetro BT em esquema de dose múltipla	125
Figura 50-	Parâmetro BD em esquema de dose múltipla	125
Figura 51-	Parâmetro uréia em esquema de dose múltipla	127
Figura 52-	Parâmetro creatinina em esquema de dose múltipla	127
Figura 53-	Parâmetro amilase em esquema de dose múltipla	128
Figura 54-	Parâmetro hematócrito em esquema de dose múltipla	130
Figura 55-	Parâmetro eritrócitos em esquema de dose múltipla	130
Figura 56-	Parâmetro hemoglobina em esquema de dose múltipla	131
Figura 57-	Parâmetro VCM em esquema de dose múltipla	131
Figura 58-	Parâmetro HCM em esquema de dose múltipla	132
Figura 59-	Parâmetro CHCM em esquema de dose múltipla	132

Figura 60-	Parâmetro leucócitos em esquema de dose múltipla	134
Figura 61-	Parâmetro linfócitos em esquema de dose múltipla	134
Figura 62-	Parâmetro eosinófilos em esquema de dose múltipla	135
Figura 63-	Parâmetro monócitos em esquema de dose múltipla	135
Figura 64-	Parâmetro bastonetes em esquema de dose múltipla	136
Figura 65-	Parâmetro segmentados em esquema de dose múltipla	136
Figura 66-	Parâmetro TP em esquema de dose múltipla	138
Figura 67-	Parâmetro TTPA em esquema de dose múltipla	138
Figura 68-	Aspecto histológico do grupo controle (H ₂ O).....	141
Figura 69-	Aspecto histológico do grupo controle (H ₂ O).....	141
Figura 70-	Aspecto histológico do grupo controle DMSO	142
Figura 71-	Aspecto histológico do grupo controle DMSO	142
Figura 72-	Aspecto histológico do grupo tratado com RFP50 dose única.....	144
Figura 73-	Aspecto histológico do grupo tratado com RFP100 dose única.....	144
Figura 74-	Aspecto histológico do grupo tratado com RFP50 dose única.....	144
Figura 75-	Aspecto histológico do grupo tratado com OFLX40 dose única.....	146
Figura 76-	Aspecto histológico do grupo tratado com OFLX80 dose única.....	146
Figura 77-	Aspecto histológico do grupo tratado com OFLX160 dose única.....	146
Figura 78-	Aspecto histológico do grupo tratado com MINO10 dose única.....	148
Figura 79-	Aspecto histológico do grupo tratado com MINO20 dose única.....	148
Figura 80-	Aspecto histológico do grupo tratado com MINO40 dose única.....	148
Figura 81-	Aspecto histológico do grupo tratado com ROM I dose única.....	150
Figura 82-	Aspecto histológico do grupo tratado com ROM II dose única.....	150
Figura 83-	Aspecto histológico do grupo tratado com ROM III dose única.....	150
Figura 84-	Aspecto histológico do grupo tratado com RFP100 dose múltipla.....	152
Figura 85-	Aspecto histológico do grupo tratado com OFLX80 dose múltipla.....	152
Figura 86-	Aspecto histológico do grupo tratado com MINO20 dose múltipla.....	153
Figura 87-	Aspecto histológico do grupo tratado com ROM II dose múltipla.....	153

RESUMO

Malfará, W.R. **Estudo da correlação dose/concentração plasmática e de alterações bioquímicas, hematológicas, hemostáticas e histopatológicas induzidas pela rifampicina, ofloxacina e minociclina, em ratos Wistar.** 2005. 209 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

A hanseníase, doença crônica, granulomatosa, infecto-contagiosa, transmitida pelo *Mycobacterium leprae*, ainda se mantém prevalente nos dias atuais, principalmente em países subdesenvolvidos. A OMS propôs aos países endêmicos um novo esquema terapêutico alternativo para pacientes com hanseníase paucibacilar com lesão única, que vem sendo implantado gradativamente no Brasil, constituindo-se da administração de rifampicina (600mg), ofloxacina (400mg) e minociclina (100mg), em dose única. Sendo uma estratégia recente, estudos são necessários para se avaliar a toxicidade principalmente na associação medicamentosa dos fármacos. O objetivo deste trabalho foi investigar a correlação dose/concentração plasmática versus alterações bioquímicas, hematológicas, hemostáticas e histopatológicas da administração da rifampicina, ofloxacina e minociclina a ratos machos Wistar, em regime de dose única e múltiplas em monoterapia e na associação medicamentosa. Após a administração intraperitoneal dos fármacos nos animais, foi determinada a concentração plasmática por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e avaliação dos parâmetros bioquímicos, hematológicos, hemostáticos e histopatológicos. A rifampicina e ofloxacina sofreram um aumento na concentração plasmática em esquema de dose única quando administradas associadas, e a minociclina uma redução. Em esquema de doses múltiplas, a rifampicina sofreu redução na concentração plasmática, a ofloxacina aumento, e a minociclina não sofreu alteração significativa, provavelmente por interferências em processos farmacocinéticos. Na análise bioquímica concluímos que houve alteração hepática e renal nos animais que receberam a rifampicina e o esquema ROM em dose única, fato não observado em regime de doses múltiplas. Com os parâmetros hematológicos e hemostáticos não obtivemos resultados suficientes para afirmar uma alteração clinicamente importante. A histopatologia confirmou a lesão hepática induzida por todos os fármacos em esquema de dose única e múltiplas, complementando de forma satisfatória o estudo proposto. Concluímos que a rifampicina provavelmente seja a principal responsável por alterações hepáticas e renais, e que as interações medicamentosas envolvendo o fármaco exigem estudos individualizados principalmente quando o fármaco é usado associado a ofloxacina e minociclina, que podem estar ligados a reações adversas de origem idiossincrásica.

Palavras-chave: Esquema ROM. Rifampicina. Concentração plasmática. Alterações hepáticas, renais, hematológicas e histopatológicas.

SUMMARY

Malfará, W.R. **Study of the dose/plasma concentration correlation and changes biochemical, hematologic, hemostatic and histopathological induced by rifampicin, ofloxacin and minocycline in Wistar rats.** 2004. 209 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

Leprosy, a chronic granulomatous infectious-contagious disease transmitted by *Mycobacterium leprae*, continues to be prevalent today, especially in underdeveloped countries. The WHO has proposed a new alternative treatment scheme to endemic countries for patients with paucibacillary leprosy with a single lesion. This scheme is being gradually implanted in Brazil and consists of the administration of rifampicin (600 mg), ofloxacin (400 mg) and minocycline (100 mg) in a single dose. Since this is a recent strategy, studies are necessary to determine the toxicity of the treatment, especially regarding the medicamentous combination of the drugs. The objective of the present study was to investigate the dose/plasma concentration correlation regarding biochemical, hematologic, hemostatic and histopathological changes induced by the administration of rifampicin, ofloxacin and minocycline to male Wistar rats as a single dose or multiple doses in monotherapy and polytherapy. After intraperitoneal administration of the drugs, their plasma concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and the biochemical, hematologic, hemostatic and histopathological parameters were determined. Plasma rifampicin and ofloxacin concentrations were increased in the single dose scheme when administered in combination, whereas minocycline concentration was reduced. When administered in the multiple dose scheme, rifampicin showed reduction in plasma concentration, ofloxacin showed increase, and minocycline showed no significant change, probably due to interferences in the pharmacokinetic processes. Biochemical analysis revealed hepatic and renal changes in the animals that received rifampicin and the ROM scheme in a single dose, a fact not observed in the multiple dose regimen. Regarding the hematologic and hemostatic parameters, we did not obtain sufficient result to indicate a clinically important alteration. Histopathology confirmed the hepatic damage induced by all drugs administered as a single dose or multiple doses, satisfactorily complementing the proposed study. We conclude that rifampicin may probably be the drug mainly responsible for the hepatic and renal changes and that medicamentous combinations involving this drug require individualized studies, especially when the drug is used in combination with ofloxacin and minocycline, that may be linked to adverse reactions of idiosyncratic origin.

Key-words: ROM scheme. Rifampicin. Plasma concentration. Hepatic, renal and histopathological changes.

1 INTRODUÇÃO

Nos países subdesenvolvidos, o uso da tecnologia importada e a falta de tecnologia adequada aos problemas de saúde locais, fazem com que o foco de atenção se desloque para os agravos a saúde, característicos das áreas desenvolvidas, em detrimento de doenças como a tuberculose, a malária e a hanseníase, que se mantêm prevalentes no mundo subdesenvolvido, mesmo em grandes centros urbanos (BRASIL, 1989).

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo que atinge pele e nervos e causa sérias incapacidades físicas e sociais quanto mais tardio for o seu diagnóstico e tratamento. O contágio se dá através do contato entre indivíduos sadios e casos contagiantes da doença (multibacilares) sem tratamento. Estudos mostram que grande parte da população é resistente a doença, entretanto pode-se garantir que a doença encontra-se em expansão quando muitas pessoas são atingidas, em especial as crianças, e quando aparecem doentes com incapacidades físicas no momento do diagnóstico (ARAÚJO, 2003; BRASIL, 1999).

Segundo a Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária da Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL, 1989), o Brasil teve a iniciativa pioneira de substituir oficialmente o termo “lepra” por hanseníase. Essa medida, entretanto, não tem se mostrado suficiente para, por si só, eliminar os estigmas. Em primeiro lugar, por sua adoção não ter sido universal, e o termo “lepra” continuar sendo utilizado como sinônimo de hanseníase. Em segundo lugar, e principalmente, porque a adoção não foi acompanhada de um esforço educativo, no sentido de mudar as atitudes diante da doença. Assim, ainda hoje, continuam vigentes leis que discriminam o doente de hanseníase, impedindo sua reabilitação social, e persiste, mesmo entre os profissionais de saúde, um

comportamento estigmatizante, que desestimula o portador a prosseguir no tratamento da doença e, inclusive, cerceia seu acesso aos recursos de saúde disponíveis.

O Brasil ocupa o segundo lugar do mundo em número absoluto de casos de hanseníase, sendo o primeiro das Américas. A doença é endêmica em todo o território nacional, embora com distribuição irregular. As regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste são as que apresentam as maiores taxas de detecção e prevalência da doença (Figura 1) (BRASIL, 1999; ISHII, 2003).

É necessário que se encare a hanseníase como ela realmente é, diferente sem dúvida, da lepra que pode ser definida como doença lendária, a mais antiga de todas, que provoca queda espontânea dos dedos e do nariz, o apodrecimento em vida e é o fruto de um castigo divino, mas que não existe nem é semelhante a qualquer entidade nosológica existente. Não sendo sinônimo de “lepra”, entretanto a hanseníase não deixa de ser uma doença grave, potencialmente incapacitante e contagiosa, embora com baixa patogenicidade, e que se situa, por sua alta prevalência, entre as endemias nacionais de maior importância, sendo, pois, um dos mais sérios problemas de saúde pública enfrentados pelo Brasil (Figuras 2 e 4) (BRASIL, 1989).

Hoje a hanseníase é uma doença de fácil diagnóstico e tratamento. Os esquemas de Poliquimioterapia/Organização Mundial de Saúde – PQT/OMS (associação da dapsona, clofazimina e rifampicina) recomendados para o tratamento dos doentes levam a cura em períodos de tempo relativamente curtos, sendo o tratamento realizado em regime ambulatorial, nos postos de saúde da rede básica, não havendo necessidade de especialistas ou equipamentos sofisticados para o desenvolvimento das atividades de controle da doença (BRASIL, 1999).

Em 1991, a Organização Mundial de Saúde, com os resultados da queda do número de casos registrados graças à implantação da PQT/OMS, propôs a eliminação da doença como problema de saúde pública do mundo, ou seja, que até o ano 2000 todos os países endêmicos alcançassem a taxa de prevalência menor que um doente para cada 10.000 habitantes. No Brasil, a taxa de prevalência registrada para 1997 foi de 5,5/10.000 habitantes (Figuras 2 e 3). Esta taxa, porém varia de 0,53/10.000 habitantes no Rio Grande do Sul até 17,39/10.000 habitantes no Amazonas (BRASIL, 1999; RAMOS e SILVA; REBELLO, 2001).

Em reunião promovida pela OMS em Abdijan, na Costa do Marfim, em 1999, o Brasil assumiu novo compromisso de eliminar a doença até o final do ano de 2005, quando pelo menos 16 estados do país que representam 80% da população brasileira e detêm 48% e 45% da prevalência e detecção respectivamente, terão alcançado esta meta de eliminação (Figuras 1 e 2) (BRASIL, 1999).

Em 1999, a Área Técnica de Dermatologia Sanitária instituiu novo Comitê Assessor para a área de hanseníase, atualizando todas as normas técnicas, com indicação de novos Centros de Referência, além de instruções normativas que recomendam esquemas terapêuticos para pacientes multibacilares, que consiste em 12 doses mensais supervisionadas de rifampicina (RFP 600mg) associada a clofazimina (300mg), associado a doses diárias de dapsona (100mg) e clofazimina (50mg). Recentemente, como tratamento alternativo tem-se o esquema ROM (Rifampicina+Ofloxacina+Minociclina), administrado em dose única a pacientes paucibacilares com lesão única, podendo ainda, ser utilizado para a doença na forma multibacilar, na impossibilidade do paciente utilizar a clofazimina. Mesmo com a possibilidade de utilização do esquema ROM para multibacilares, no Brasil o esquema foi preconizado apenas para os casos paucibacilares com lesão única (BRASIL, 1999, 2001; ISHII, 2003; RAMOS e SILVA; REBELLO, 2001).

ESTADOS COM RELAÇÃO À ELIMINAÇÃO DA HANSENÍASE ATÉ E APÓS 2005

Figura 1. Distribuição da hanseníase no Brasil (BRASIL, 1999)

SITUAÇÃO DA HANSENÍASE NO BRASIL, APÓS ASSUMIR A META DE ELIMINAÇÃO EM 1991 (44ª ASSEMBLÉIA MUNDIAL DE SAÚDE)

* Coeficientes estimados

FONTE: ATDS/DGPE/SPS/MS; SES/IBGE

Figura 2. Coeficiente de prevalência da hanseníase no Brasil (BRASIL, 1999)

Figura 3. Casos novos de hanseníase detectados no Brasil (BRASIL,1999)

Figura 4. Prevalência da hanseníase por região (BRASIL, 1999)

Novos esquemas alternativos instituídos estão sendo realizados gradualmente, com o objetivo de se investigar a eficácia terapêutica em um curto espaço de tempo, associada ao mínimo de efeitos adversos. Porém, o grande desafio é a avaliação da diminuição da suscetibilidade individual às recaídas, fator preocupante que dificulta a erradicação da doença.

Esses esquemas são utilizados nos Centros Colaboradores (de Referência) que detenham, em seus quadros, dermatologista ou clínico com experiência em hanseníase, bem como técnicas auxiliares para o diagnóstico, acompanhamento e seguimento dos pacientes pós-alta, ou em outras Unidades de Saúde, sob orientação dos Centros Colaboradores (BRASIL, 1999).

O Ministério da Saúde/ATDS recomenda a adoção do esquema ROM (RIFAMPICINA, MINOCICLINA e OFLOXACINA) para pacientes paucibacilares com lesão única de pele, sem envolvimento de tronco nervoso (BRASIL, 2001).

DROGA	DOSE ADULTO	DOSE CRIANÇA	TEMPO DE TRATAMENTO
Rifampicina	600 mg	300 mg	PB - Dose única
Ofloxacina	400 mg	200 mg	
Minociclina	100 mg	50 mg	

O esquema ROM não é recomendado para gestantes e crianças menores de 5 anos de idade.

Os pacientes que fazem o tratamento com o esquema ROM recebem alta, por cura, após a tomada da dose única.

Outras possibilidades terapêuticas também são sugeridas aos pacientes que estão impossibilitados de utilizar os esquemas já preconizados. Assim, segue-se alguns exemplos com as respectivas alternativas (BRASIL, 2001).

Na impossibilidade absoluta de utilizar Dapsona.

DROGA	PAUCIBACILAR	MULTIBACILAR
Rifampicina (RFM) Clofazimina (CFZ)	600 mg uma vez por mês, supervisionada 50 mg diárias ou 100 mg, em dias alternados	600 mg uma vez por mês, supervisionada e 300 mg uma vez por mês supervisionada, 100 mg em dias alternados ou 50mg diárias, auto-administradas
Seguimento dos casos	<ul style="list-style-type: none"> • Comparecimentos mensais para medicação supervisionada, num total de 6 doses • Revisão dermatoneurológica na 6ª dose • Para alta, aplicar os critérios de cura 	<ul style="list-style-type: none"> • Comparecimentos mensais para medicação supervisionada, num total de 12 doses • Revisão dermatoneurológica na 12ª dose • Para alta, aplicar os critérios de cura
Critérios de alta por cura	<ul style="list-style-type: none"> • Receberão alta, por cura, os pacientes que completarem as 6 doses de poliquimioterapia, supervisionada, em até 9 meses, independentemente do número de faltas consecutivas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Receberão alta, por cura, os pacientes que completarem as 12 doses de poliquimioterapia, supervisionada, em até 18 meses, independentemente do número de faltas consecutivas.

Na impossibilidade absoluta de utilizar Rifampicina, Dapsona e Rifampicina.

PAUCIBACILAR	MULTIBACILAR
6 meses Ofloxacina - 400 mg diários auto-administrado Minociclina - 100 mg diários auto-administrado Clofazimina - 50 mg diários auto-administrado	6 meses Ofloxacina - 400mg diários auto-administrado Minociclina - 100 mg diários auto-administrado Clofazimina - 50 mg diários auto-administrado
	18 meses Ofloxacina - 400 mg diários auto-administrado Clofazimina - 50 mg diários auto-administrado Ou Minociclina - 100 mg diários auto-administrado Clofazimina - 50 mg diários auto-administrado
Seguimento do caso <ul style="list-style-type: none"> • Comparecimentos mensais para a avaliação • Revisão dermatoneurológica na 6ª dose para a alta por cura • Para alta, necessária ausência de sinais de atividade clínica 	Seguimento do caso <ul style="list-style-type: none"> • Comparecimentos mensais para a avaliação • Revisão dermatoneurológica e baciloscopia na 12ª e 24ª doses (alta)

Na impossibilidade absoluta de utilizar CLOFAZIMINA (Pacientes Multibacilares)

MULTIBACILAR
Ofloxacina - 400mg diários, auto-administrados, ou Minociclina - 100mg diários, auto-administrados
Dapsona - 100mg diários, auto-administrados Rifampicina - 600 mg mensal, supervisionada Tempo de duração - 12 meses Ou
Rifampicina - 600mg mensal, supervisionada Ofloxacina - 400 mg mensal, supervisionada Minociclina - 100 mg mensal, supervisionada Tempo de duração - 24 meses

Assim, como se observa, o esquema ROM é alternativo não só para a forma paucibacilar, bem como para a multibacilar, além dos fármacos (Rifampicina, Ofloxacina e Minociclina) serem incluídos em outros esquemas terapêuticos alternativos, ratificando assim, a necessidade de maiores estudos que possam elucidar de maneira clara a relação dose, concentração plasmática e possíveis alterações bioquímicas, hematológicas, hemostáticas e histopatológicas decorrentes da utilização das mesmas.

Queiroz et al. (2002), detectaram várias anormalidades bioquímicas e hematológicas em pacientes que fizeram tratamento com a clofazimina, ressaltando a importância de realizar estudos que correlacionem o uso de fármacos com efeitos adversos.

Ji et al. (1992) em trabalho experimental em camundongos, evidenciaram ação bactericida da rifampicina quando associada a ofloxacina e a minociclina, frente ao *M. leprae*.

Vijayakumaram et al. (1997) observaram em pacientes hansenianos em tratamento com rifampicina e ofloxacina administradas durante quatro semanas (doses diárias supervisionadas), leucopenia na terceira semana de tratamento, juntamente com febre, indisposição, náusea e falta de apetite.

A claritromicina e a minociclina possuem potente atividade bactericida contra o *M. leprae* em pacientes hansenianos, podendo ser consideradas importantes componentes para os novos regimes de tratamento da hanseníase multibacilar (JI et al., 1993).

Posteriormente observou-se uma ação bastante efetiva da rifampicina, ofloxacina e minociclina frente ao *M. leprae*, em animais e em pacientes hansenianos (JI et al., 1998).

Mane, Cartel e Grosset (1997) confirmaram a eficácia do esquema ROM em pacientes pauci e multibacilares, evidenciada por uma diminuição significativa da atividade do *M. leprae*. Uma eficácia comprovada também foi observada com relação à presença de granulomas e bacilos, que foram significativamente reduzidos após a terapia (EBENEZER; JOB, 1999).

Grosset et al. (1988) ressaltaram a eficácia da ofloxacina frente ao *M. leprae*, em ratos.

Majumder et al. (2000) observaram boa eficácia do esquema ROM em pacientes hansenianos paucibacilares associado a uma vacina.

O esquema ROM foi responsável pela morte de mais de 99% do *M. leprae*, confirmando a eficácia da terapia em pacientes hansenianos paucibacilares (GROSSET, 2001).

Costa et al. (2001) realizaram trabalho comparativo de lesões da hanseníase paucibacilar em pacientes brasileiros, evidenciando também a eficácia do esquema ROM.

Alangaden e Lerner (1997) constataram que as fluoroquinolonas são eficazes contra as micobactérias, especialmente na tuberculose e hanseníase. Constataram também que estas

devem ser administradas com um ou mais agentes ativos contra o *Mycobacterium leprae*, não ocorrendo dessa maneira, resistência bacteriana.

Estudos consideram que a ofloxacina poderia ser um fármaco alternativo nos casos de resistência a rifampicina ou nos casos em que a mesma é contra-indicada (SAMPOONACHOT et al., 1997).

Gelber et al. (1994) evidenciaram a eficácia da minociclina em pacientes hansenianos, administrada em regime de dose única de 200 e 100 mg uma e duas vezes ao dia, durante três meses. Observaram que os efeitos foram satisfatórios, com dose de 100mg uma vez ao dia, podendo assim minimizar possíveis efeitos adversos.

Apesar das constatações da efetividade do esquema ROM, não existe uma comprovação com relação a possíveis alterações que a associação dos fármacos pode resultar, principalmente onde a terapia é indicada como alternativa, sendo administrada em doses múltiplas.

A interação entre fármacos representa um papel importante na terapia farmacológica, sejam essas interações de origens farmacodinâmicas ou farmacocinéticas, representando uma grande fonte de problemas clínicos (KREMERS, 2002).

A modificação dos efeitos farmacológicos por interação entre fármacos podem aumentar ou diminuir a eficácia terapêutica bem como acentuar ou atenuar os efeitos indesejáveis. Podem aparecer também efeitos totalmente novos, diferentes dos observados com quaisquer das drogas utilizadas isoladamente, ou pode não ocorrer nenhuma modificação no efeito final, apesar da cinética e do metabolismo de uma ou ambas as drogas terem sido alterados.

Muitos regimes onde se administra múltiplos fármacos podem induzir a um risco de interações adversas, modificando a absorção, distribuição, biotransformação e excreção e ou modificar um efeito clínico (AMENT; BERTOLINO; LISZEWSKI, 2000).

O citocromo P₄₅₀ representa uma superfamília de hemoproteínas que possui como função realizar o metabolismo oxidativo de xenobióticos e substâncias endógenas, em trabalho descrito por Nelson et al. (1996 apud MATSUNAGA et al., 2004, p.428).

A Gly-P é uma proteína de transporte localizada na barreira hematoencefálica, intestino, células epiteliais e túbulo renal, regulada pelo gene MDR-1, e tem importantíssimo papel na farmacocinética de fármacos, mais precisamente na absorção, distribuição e eliminação (COLLETT; TANIANIS-HUGHES; WARHURST, 2004; FROMM, 2002; LIN; YAMAZAKI, 2003).

Salphati e Benet (1998), em trabalho realizado em ratos machos e fêmeas, observaram que a regulação gênica do CYP e da Gly-P é realizada por mecanismo independente, porém ambas têm a sua expressão e regulação dependentes do gênero.

Nelson, D.R. et al. P₄₅₀ superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, London, v. 6, p.1-42, 1996.

1.1 FARMACOCINÉTICA - GENERALIDADES

Rifampicina

As rifampicinas constituem um grupo de antibióticos macrocíclicos complexos, estruturalmente semelhantes, produzidos por *Streptomyces mediterranei*. Inibe a atividade da RNA-polimerase DNA-dependente de micobactérias e outros microrganismos ao formar um complexo fármaco-enzima estável, resultando em supressão do início da formação da cadeia (mas não seu alongamento) na síntese de RNA (PETRI, 2001).

A administração oral de rifampicina produz concentrações máximas no plasma em 2 a 4 horas; após a ingestão de 600mg, este valor é de 7µg/mL, embora haja considerável variabilidade (PETRI, 2001). As variações na taxa de absorção da rifampicina são atribuídas a taxa de dissolução do fármaco, motilidade gástrica e ou secreção biliar (AGRAWAL et al., 2004).

Após absorção pelo trato gastrointestinal, a rifampicina sofre rápida eliminação na bile, com conseqüente circulação entero-hepática. Durante esse período ocorre desacetilação progressiva do fármaco de modo que, depois de 6 horas, quase todo o antibiótico presente na bile encontra-se na forma desacetilada. A reabsorção intestinal é reduzida por desacetilação (bem como pela presença de alimento) e, por conseguinte, o metabolismo facilita a eliminação do fármaco. A meia-vida da rifampicina diminui progressivamente em cerca de 40% durante os primeiros 14 dias de tratamento, devido à indução de enzimas microsossomais hepáticas, com aceleração de desacetilação do fármaco (PETRI, 2001).

Até 30% de uma dose são excretados na urina, enquanto 60 a 65% são excretados nas fezes; menos da metade desta quantidade pode consistir em antibiótico inalterado. Não é

necessário efetuar nenhum ajuste da posologia em pacientes com comprometimento da função renal (PETRI, 2001).

A rifampicina distribui-se por todo o organismo, sendo encontrada em concentrações eficazes em muitos órgãos e líquidos corporais, como o líquido cefalorraquidiano (LCR). A sua presença é bem demonstrada pelo fato do fármaco ter a capacidade de conferir coloração laranja-avermelhada à urina, fezes, saliva, escarro, lágrimas e suor, sendo preciso informar ao paciente sobre esta coloração (PETRI, 2001).

Alguns pacientes fazendo uso da rifampicina podem apresentar reações adversas significativas, sendo as mais comuns: exantema, febre, náuseas e vômitos (GROSSET; LEVENTS, 1983).

A administração de rifampicina em esquema intermitente (menos de duas vezes por semana) e/ou em doses diárias de 1.200mg ou mais está associada a efeitos adversos freqüentes, de modo que o fármaco não deve ser utilizado dessa forma. Em 20% dos pacientes tratados verifica-se o desenvolvimento de uma síndrome semelhante à gripe, com febre, calafrios e mialgias. A síndrome também pode incluir eosinofilia, nefrite intersticial, necrose tubular aguda, trombocitopenia, anemia hemolítica e choque (GIRLING; HITZE, 1979).

Sodhi et al. (1997a) observaram, em ratos, dano hepático provocado pela rifampicina administrada i.p. (50mg/kg/dia) e, paralelamente, lipoperoxidação em todos os animais tratados, com diminuição na atividade da superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

Sodhi et al. (1997b) observaram em ratos jovens que receberam rifampicina associada a isoniazida (50mg/kg/dia de cada), hepatotoxicidade, com depósito gorduroso microvesicular e concluíram que a hepatotoxicidade proveniente da administração da rifampicina pode mediar estresse oxidativo, quando associada a isoniazida.

Segundo Lakshminarayan, Sahn e Hudson (1973), o uso de rifampicina tem sido relacionado com alterações hematológicas, sendo a anemia hemolítica observada com maior frequência, trombocitopenia e hemólise aguda, em casos de pacientes hiperreativos.

Da mesma forma, Souza, Alberto e Foss (1997), constataram a ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CID) e necrose hepática hemorrágica, em paciente hanseniano que recebeu 600mg de rifampicina em regime de dose mensal.

Khedun, Maharaj e Leary (1992), verificaram em trabalho “*in vitro*” com fígado de ratos que a administração crônica de rifampicina alterou a função hepática, com evidências histológicas e dano hepático, diminuição na concentração de glicose e dos níveis de lactato, observando-se alterações lipídicas.

A rifampicina pode ainda atuar como indutora enzimática de enzimas do citocromo P₄₅₀, sendo observado uma auto-indução, diminuindo o tempo de meia vida da mesma, através da subfamília CYP3A (STROLIN; DOSTERT, 1994).

Van Den Broek, Teunissen e Breimer (1981) observaram em trabalho experimental, uma indução do metabolismo hepático da antipirina e do hexobarbital, com uma diminuição significativa na meia vida dos mesmos. Concluíram assim que a rifampicina é um potente indutor do metabolismo de fármacos que são biotransformados pelo sistema microsomal hepático.

Segundo Saima et al. (2002) a rifampicina diminuiu consideravelmente a biodisponibilidade da nilvadipina e, conseqüentemente, o seu efeito hipotensor em voluntários sadios.

De acordo com Niemi et al. (2003), a rifampicina pode induzir várias isoformas do citocromo P₄₅₀, modificando assim a concentração plasmática de vários fármacos, incluindo antibacterianos como fluoronoquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, além de várias outras

classes farmacológicas, como antiinflamatórios, anticoagulantes orais, antiepilépticos e psicotrópicos.

A rifampicina pode reduzir a concentração plasmática da glipizida, provavelmente por indução do CYP2C9 e também da glicoproteína-P, aumentando a fração eliminada da mesma (NIEMI et al., 2001).

Em trabalho com coelhos Weber et al. (2001), observaram que a rifampicina aumentou significativamente o clearance do triazolam, e dois metabólitos hidroxilados, relacionando-se o resultado com a indução do CYP3A6.

Ridditid et al. (2002), em trabalho com voluntários sadios, observaram que a rifampicina diminuiu a concentração plasmática do praziquantel administrado em dose única e múltipla, sugerindo que os dois fármacos não sejam administrados concomitantemente.

A indução enzimática provocada pela rifampicina também ocorre em várias classes farmacológicas, incluindo o pefloxacin e a doxiciclina (FINCH et al., 2002).

Dilger, Hofmann e Klotz (2000) observaram uma indução enzimática em idosos, interferindo na farmacocinética e na farmacodinâmica da propafenona, que é biotransformada pelo CYP2D6, 3A4 e 1A2, resultando em redução da concentração plasmática e insuficiência na resposta antiarrítmica.

A rifampicina é um potente indutor do citocromo P450 hepático e intestinal e da Gly-P do sistema de transporte, o que resulta em numerosas interações medicamentosas clinicamente significativas, incluindo interações com ciclosporina, glicocorticóides, cetoconazol ou itraconazol, inibidores da protease relativos ao HIV, zidovudina, nifedipina e midazolam (FINCH et al., 2002).

Westphal et al. (2000) observaram aumento na secreção intestinal do taninolol em humanos, ressaltando a importância do novo tipo de interação entre drogas envolvendo a glicoproteína-P.

Paine et al. (2002), em trabalho com voluntários sadios, evidenciaram que a interação da eritromicina e rifampicina não pode ser atribuída somente a indução do CYP3A4, mas também a uma indução da Gly-P intestinal pela rifampicina.

Lilja, Niemi e Neuvonen (2004) descreveram, em humanos, a ação da rifampicina sobre a farmacocinética do celiprolol e observaram que a rifampicina reduz sua concentração plasmática, pela indução da glicoproteína P intestinal, diminuindo a sua absorção.

Ofloxacina

A introdução da ofloxacina (fluoroquinolona) representa um progresso terapêutico particularmente importante, visto que esse fármaco é dotado de ampla atividade antimicrobiana e mostra-se eficaz, após a administração oral, no tratamento de uma grande variedade de doenças infecciosas. Atua no DNA bacteriano e inibe a topoisomerase II de células eucarióticas em concentrações muito elevadas (PETRI, 2001).

As quinolonas são bem absorvidas após administração oral e distribuem-se amplamente pelos tecidos do corpo. Os níveis séricos máximos das fluoroquinolonas são alcançados dentro de 1 a 3 horas após uma dose oral de 400mg. Os alimentos não prejudicam a absorção oral, porém podem retardar o momento da concentração sérica máxima. As doses orais em adultos são de 200 a 400mg, a cada 12 horas, para a ofloxacina. A biodisponibilidade das fluoroquinolonas é superior a 50% para todos os agentes e ultrapassa 95% para alguns fármacos. A meia-vida sérica varia de 3 a 5 horas, tendo-se um alto volume de distribuição, sendo que as concentrações observadas na urina, rim, pulmão e tecido prostático, fezes, bile, macrófagos e neutrófilos são maiores do que os níveis séricos. As concentrações das quinolonas no líquido cefalorraquidiano e no prostático são inferiores às do soro. Os níveis de perfloxacina e ofloxacina no líquido ascítico aproximam-se dos níveis séricos (PETRI, 2001).

As vias de eliminação diferem entre as quinolonas. A depuração renal predomina para a ofloxacina, lomefloxacina e cinoxacina. A perfloxacina e o ácido nalidíxico são predominantemente eliminados por via não renal. É necessário efetuar um ajuste da dose em pacientes com insuficiência renal tratados com ofloxacina (PETRI, 2001).

As reações adversas mais comuns são náusea, desconforto abdominal, cefaléia e tontura. Pode ocorrer erupções cutâneas, incluindo reações de fotossensibilidade. A administração concomitante de antiinflamatório não-esteróide pode potencializar os efeitos estimulantes das quinolonas sobre o sistema nervoso central, sendo relatadas convulsões (MANDELL; PETRI, 1996).

Segundo McLellan et al. (1996), em estudos com ciprofloxacina e norfloxacina em humanos e em ratos, observaram uma inibição nas isoformas 3A4 e 3A2 respectivamente, concluindo que os fármacos podem interferir consideravelmente na concentração plasmática de fármacos que sejam biotransformados pela mesma via.

Orisakwe et al. (2004) investigou a interferência da pefloxacina sobre a excreção urinária da rifampicina e concluiu que a pefloxacina aumenta a absorção e a excreção urinária da rifampicina por redução na motilidade gastrointestinal, e por aumento na secreção da rifampicina, através de mecanismo competitivo no clearance hepático, favorecendo a pefloxacina.

Rabbaa et al. (1996) concluíram que a eliminação renal da ofloxacina em ratos é mediada pela glicoproteína-P, e que a mesma pode estar envolvida inclusive no processo de absorção.

Segundo Royer (1996), as fluoroquinolonas não demonstram efeitos adversos severos, estando estes, mais relacionados a reações de hipersensibilidade, destacando-se alterações cutâneas, reações anafiláticas e falência renal.

O fígado e os rins são os órgãos alvo para reações adversas às quinolonas embora estas reações sejam raramente observadas. Aumento transitório na aspartato-aminotransferase e fosfatase alcalina podem ser observadas com todas as fluoroquinolonas, com relato de um caso de insuficiência renal aguda relacionada a ofloxacina, e aumento na creatinina e uréia em alguns pacientes. As fluoronoquinolonas são potentes inibidores de isoenzimas hepáticas do citocromo P450 (RUEF; BLASER, 2000).

Em ratos, a ofloxacina é eliminada através do túbulo renal por um transporte catiônico e aniônico (FOOTE; HALSTENSON, 1998).

A levofloxacina é transportada pela glicoproteína-P renal, sugerindo que as quinolonas que são eliminadas por secreção tubular também possam ser submetidas ao mesmo transporte (ITO et al., 1997).

Rabbaa et al. (1997) evidenciaram que a ofloxacina compete com outras fluoroquinolonas pelo transporte da glicoproteína-P intestinal de ratos.

Minociclina

As tetraciclinas possuem um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias aeróbicas e anaeróbicas gram-positivas e gram-negativas, que supera o de muitos outros medicamentos antimicrobianos. A minociclina e a doxicilina, que são medicamentos mais lipofílicos, freqüentemente são os mais ativos, seguidos pela tetraciclina (CHAMBERS, 2001).

As tetraciclinas inibem a síntese protéica bacteriana ligando-se ao ribossomo 30S da bactéria e impedindo o acesso do RNAt. Em concentrações elevadas, estes compostos também impedem a síntese protéica em células de mamíferos. Entretanto, estas células não possuem o sistema de transporte ativo encontrado nas bactérias e, além disso, presume-se que

diferenças de sensibilidade em nível ribossômico sejam determinantes importantes da ação seletiva das tetraciclina (CHAMBERS, 2001).

A maioria das tetraciclina é absorvida de forma incompleta pelo trato gastrointestinal, porém, a minociclina demonstra 100% de absorção, diferindo das demais. A porcentagem não absorvida do medicamento eleva-se à medida que a dose administrada aumenta. A maior parte da absorção se dá no estômago e intestino delgado superior e é maior em jejum. A absorção das tetraciclina é prejudicada pela ingestão concomitante de laticínios, géis de hidróxido de alumínio, complexos à base de cálcio, magnésio e ferro ou zinco. O mecanismo responsável pela queda da absorção parece ser a quelação dos cátions divalentes e trivalentes. A doxicilina e a minociclina devem ser administradas em doses diárias ainda menores por via oral, visto que suas meias-vidas são longas (16 e 18 horas) e sua absorção é mais significativa. Os alimentos não interferem na absorção da minociclina (CHAMBERS, 2001).

As tetraciclina distribuem-se amplamente pelo organismo e pelos tecidos e secreções, incluindo a urina e a próstata. Elas acumulam-se nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea, além de ossos, dentina e esmalte dos dentes que ainda não irromperam (CHAMBERS, 2001).

A minociclina é metabolizada de forma significativa pelo fígado, sendo eliminada principalmente pela urina e fezes em teores muito inferiores aos das outras tetraciclina. A depuração renal da minociclina é baixa. A substância permanece no organismo após interrupção da terapia o que pode ser decorrente de sua retenção na gordura tecidual. A meia-vida da minociclina não se prolonga em pacientes com insuficiência hepática (CHAMBERS, 2001).

Todas as tetraciclina produzem irritação gastrointestinal em diferentes graus. Estes efeitos são mais comuns após a administração oral desses medicamentos. Desconforto abdominal, queimação epigástrica, náuseas e vômitos podem ocorrer. Já foram relatados casos

de esofagite, úlceras esofágicas e ainda associação com pancreatite. Também pode ocorrer diarreia como resultado dos efeitos irritativos das tetraciclina administradas por via oral. Outras reações tais como fotossensibilidade, toxicidade hepática e renal, efeitos sobre os dentes e reações de hipersensibilidade também são relatadas (KAPUSNIK-UNER; SANDE; CHAMBERS, 1996).

Bocker et al. (1991) constataram que a minociclina aumentou os níveis de Aspartato Amino-Transferase (AST), uréia e bilirrubina em camundongos tratados com duas doses. Observaram ainda que, em animais tratados previamente com fenobarbital (indutor enzimático), os níveis dos três parâmetros foram ainda maiores, deduzindo que parte dos efeitos tóxicos provocados pela minociclina são produzidos por um metabólito.

Pacientes jovens que fazem uso da minociclina para acne também podem apresentar reações de hipersensibilidade levando a sérias conseqüências (DE PAZ et al., 1999).

Lawrenson et al. (2000) evidenciaram também casos de hepatotoxicidade associada ao uso de minociclina, relacionados a reações de hipersensibilidade, que ocorreram dentro de poucas semanas.

Krause (2000) descreve algumas reações irritativas gastrintestinais em pacientes que usam a minociclina e que as reações adversas são semelhantes às outras tetraciclina, e faz um alerta quanto à necessidade de monitorização de enzimas hepáticas e renais. A minociclina é eliminada completamente pelo fígado e via biliar, o que pode acelerar a sua eliminação quando associada a agentes que induzem enzimas hepáticas.

1.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

1.2.1 *Parâmetros Bioquímicos*

Todo composto constituinte do sangue representa um parâmetro bioquímico em potencial. No entanto, constituem-se biomarcadores somente aqueles compostos que aparecem em concentrações relativamente constantes e que sofrem alterações significativas diante de alguma patologia. Cabe ressaltar que a utilização do sangue total como material biológico destas análises é preferida ao plasma devido a grande discrepância entre os valores de concentração intracelular (principalmente eritrócitos) e extra celular (plasma) para alguns parâmetros. Neste sentido, o soro é ainda mais indicado visto que não há a presença de um interferente em potencial, como o anticoagulante adicionado para obtenção do plasma (BISHOP; DUBEN-ENGELKIRK; FODY, 2000; KAPLAN; PESCE, 1996).

Níveis séricos de substâncias como a uréia e a creatinina são parâmetros avaliadores da função renal. A uréia é um dos principais catabólitos dos aminoácidos, produzida pelo fígado no ciclo da ornitina, a partir da união de dois grupamentos amínicos, liberados na degradação dos aminoácidos, com uma molécula de dióxido de carbono. A uréia é, portanto, produzida em ritmo constante sendo lançada no sangue para sofrer filtração ao passar pelos rins. Nas unidades filtrantes dos rins, os néfrons, a uréia sofre filtração glomerular e, em seguida, ao passar pelos túbulos nefróticos pode sofrer reabsorção parcial. A fração de uréia que não sofre reabsorção constitui um dos mais importantes produtos de excreção urinária. A creatinina por sua vez, é produzida pela utilização da fosfocreatina muscular. Quando o músculo é exercitado, a molécula de fosfocreatina é desfosforilada para a obtenção da energia necessária ao trabalho muscular, sendo que a molécula de creatina restante sofre ciclização não enzimática transformando-se em creatinina. Com exceção do efeito de exercício físico intenso ou da quase total falta de exercício, a creatinina é produzida num ritmo relativamente

constante e lançada ao sangue para sofrer filtração ao passar pelos rins. Nos néfrons, a creatinina sofre filtração glomerular, sendo que uma parte da creatinina que forma a urina, pode advir diretamente da secreção tubular. Desta forma, estados patológicos como a insuficiência renal e obstruções urinárias, provocam a diminuição da depuração renal da uréia da creatinina, com conseqüente acúmulo sérico destes metabólitos. Assim, estes estados patológicos podem ser detectados pelas alterações nos níveis séricos destas substâncias (BISHOP; DUBEN-ENGELKIRK; FODY, 2000; KATO et al., 1991; KIM; NA, 1991; RODRIGUES, 2002).

As bilirrubinas séricas e as enzimas hepato-colestáticas alteradas no soro indicam comprometimento na atividade hepática ou do conduto biliar. A bilirrubina presente no soro pode aparecer sob duas formas, ligada a albumina (indireta) ou na forma de glicuronídeos de bilirrubina (direta). A fração ligada à albumina representa a bilirrubina recém formada no catabolismo da hemoglobina liberada da degradação dos eritrócitos. Esta bilirrubina ligada à albumina sofre metabolização nos hepatócitos conjugando-se com o ácido glicurônico e transformando-se em um glicuronídeo de bilirrubina, que é bastante hidrossolúvel e passível de filtração renal, ainda que sua principal via de eliminação seja pelo conduto biliar, para posterior eliminação intestinal. Desta forma, mais interessante que a determinação da concentração sérica total de bilirrubinas é a determinação de cada fração. Se a fração de bilirrubina ligada à albumina estiver aumentada, as alterações patológicas podem ser interpretadas como destruição exacerbada de eritrócitos, problemas na captação/transporte desta forma de bilirrubina pelo hepatócito ou problemas na conjugação, como deficiência ou competição pela enzima glicuronil-transferase. Por outro lado, se a fração de bilirrubina sérica aumentada for aquela conjugada, as alterações patológicas podem ser interpretadas como dificuldades na eliminação pós-conjugação, comumente por colestases intra ou extra-hepáticas (MILLER; GONÇALVES, 1999; RAVEL, 1997; RODRIGUES, 2002).

As enzimas que aparecem no sangue são produzidas nas células dos diferentes tecidos do organismo e, no interior destas células, atuam dentro de sua função específica. No entanto, uma pequena fração extravasa das células e ganha a corrente sangüínea. Assim, as alterações das concentrações enzimáticas no sangue são devidas mais ao aumento do extravasamento celular, do que propriamente de uma produção celular aumentada. Teoricamente, qualquer célula pode produzir as diferentes enzimas do indivíduo mas, na realidade, as enzimas são produzidas em diferentes proporções em cada tecido. Portanto, um aumento sérico significativo de uma enzima está intimamente associado a alguns danos nos principais tecidos produtores daquela enzima (KAPLAN; PESCE, 1996; MILLER; GONÇALVES, 1999; RAVEL, 1997).

A alanina-aminotransferase (ALT) e a aspartato-aminotransferase (AST) são enzimas séricas que aparecem elevadas no comprometimento hepatocelular, pois são produzidas principalmente pelo fígado, ainda que a AST produzida pelo miocárdio também tenha importante contribuição para a concentração sérica desta enzima (AMACHER, 1998; BISHOP; DUBEN-ENGELKIRK; FODY, 2000; DEN BESTEN et al., 1991; REICHLING; KAPLAN, 1988).

A fosfatase alcalina (ALP) e a gama-glutamiltransferase (GGT) são enzimas ligadas a fração microssomal e ao sistema biliar e indicam a ação de drogas nestes sistemas, como por exemplo, a colestase (KAPLAN; PESCE, 1996; TAMANO et al., 1991).

A amilase é uma enzima produzida no pâncreas e nas glândulas salivares que tem como principal função a degradação do amido em dextrina, maltose e glicose. Também é encontrada no fígado e no revestimento das trompas de Falópio.

Em 80% dos pacientes com pancreatite aguda, a amilase sérica sofre uma elevação em um período de 24h, estas elevações são da ordem de 20 vezes o limite superior da normalidade. Desta forma, a determinação da amilase constitui um método útil no diagnóstico

da pancreatite aguda. Raramente a pancreatite hemorrágica aguda alcança um grau de severidade suficiente para destruir todo o tecido pancreático. Nestes casos, apesar da lesão, a amilase é normal (McNEELY, 1986).

A amilase é uma proteína relativamente pequena e, portanto, facilmente filtrada pela urina. Esta enzima pode ser encontrada em concentrações aumentadas na urina durante um período mais prolongado que no soro. Uma amostra de urina de 2 h para determinar o conteúdo de amilase é uma excelente prova de diagnóstico para detectar a pancreatite (KAPLAN; PESCE, 1996).

A determinação da amilase se faz através de vários métodos sendo os que empregam como substrato o amido os mais utilizados.

As proteínas constituem as mais importantes moléculas orgânicas e apresentam uma ampla variedade de funções como transporte, pressão osmótica, defesa, enzimática, tampão controle e coagulação. Dentre estas estão as proteínas plasmáticas, que podem ser agrupadas em três grupos: albumina, globulinas e fibrinogênio. Quando se utiliza o soro como material biológico, apenas aparecem a albumina e globulinas. A albumina representa mais da metade do total de proteínas séricas e possui importante papel na manutenção da pressão osmótica e no transporte de substâncias lipossolúveis no plasma como ácidos graxos livres, bilirrubinas e fármacos. A determinação do total de proteínas do soro constitui o parâmetro proteínas totais cujo valor diagnóstico isoladamente é bastante reduzido, pois muitas situações clínicas apresentam aumento de uma determinada proteína com diminuição de outra, de forma que os valores de proteínas totais não se alteram significativamente. A determinação da concentração sérica de albumina melhora o significado clínico da determinação das proteínas séricas podendo assim evidenciar quadros de desidratação, hiperidratação, síndrome nefrótica, inflamações e gamaglobulinopatias (HENRY; CANNON; WINKELMAN, 1974; KAPLAN; PESCE, 1996; RODRIGUES, 2002).

1.2.2 Parâmetros Hematológicos

Um dos procedimentos mais importantes para avaliação é o exame cuidadoso dos elementos figurados do sangue, que incluem a quantificação da concentração de cada elemento, cálculo dos índices hematimétricos e uma observação microscópica meticulosa da morfologia celular. A maioria das disfunções hematológicas podem ser definidas pelas anormalidades específicas apontadas nestes procedimentos (HENRY, 1999; MILLER; GONÇALVES, 1999; RAVEL, 1997).

Os elementos figurados do sangue são classificados em eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A principal função dos eritrócitos é conduzir a hemoglobina, o pigmento encarregado do transporte do oxigênio para todos os tecidos. Os leucócitos formam um grupo heterogêneo, com cinco tipos distintos de células típicas do sangue, com o compromisso fundamental de defesa do organismo. As plaquetas são fragmentos de células com fundamental importância na coagulação do sangue (RAVEL, 1997).

A contagem de eritrócitos e outros parâmetros correlacionados constituem a série vermelha que inclui, além da contagem de eritrócitos, a determinação do índice hematócrito (relação percentual células do sangue pelo volume de sangue), da concentração de hemoglobina e dos índices hematimétricos (VCM= volume corpuscular médio, HCM= hemoglobina corpuscular média, CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média) capazes de detectar alterações provocadas pela ação de drogas sobre a eritropoese, na depleção de ferro e em estados anêmicos. A avaliação morfológica dos glóbulos vermelhos (tamanho, forma e coloração) pode permitir a caracterização de um quadro de anemia e assim contribuir de forma relevante na elucidação do mecanismo de ação concorrente para o efeito adverso (MILLER; GONÇALVES, 1999).

Com relação aos leucócitos, os parâmetros avaliados podem evidenciar a atuação de um fármaco sobre o sistema imunológico ou em reações alérgicas (BAIN, 1997; DUKES, 1984; RAVEL, 1997; YOUNG, 2000).

Uma grande parte de fármacos, que são bem tolerados pela maioria dos indivíduos, ocasionalmente induzem desordens no sistema hematopoético e, embora possam representar uma fração menor das reações adversas a fármacos, são de extrema importância pois podem diminuir funções vitais como defesa imune, integridade vascular e transporte de oxigênio (HEIMPEL, 1996).

Basicamente os efeitos adversos a medicamentos que induzem danos hematopoéticos podem ser divididos em duas categorias. A primeira representa uma toxicidade previsível e dose-dependente como acontece com os agentes usados nas terapias anti-neoplásicas, imunossupressivas ou antivirais e a segunda categoria é representada pelas reações idiossincrásicas descritas como hiperreatividade individual, congênita ou adquirida, de algum tipo (HEIMPEL, 1996).

1.2.3 Parâmetros Hemostáticos

O processo de hemostasia resulta do envolvimento de vários fatores: parede do vaso, plaquetas e outras células circulantes, coagulação e sistema fibrinolítico. Assim, substâncias potencialmente tóxicas podem interferir em um ou mais desses fatores. Testes simples para detectar falhas no sistema hemostático incluem a contagem de plaquetas, determinação do tempo de protrombina (TP) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) (BARTOSEK; GUAITANI; PACEI, 1982; COLMAN et al., 1994; KURATA; HORII, 2004).

A determinação do tempo de protrombina funciona como um avaliador do sistema extrínseco da coagulação (protrombina, fatores V, VII e X). Um fármaco que atue alterando a concentração ou disponibilidade de algum dos fatores como, por exemplo, fármacos que

provocam danos hepáticos, pode provocar a alteração do tempo de protrombina, mais comumente por um aumento deste tempo. A determinação de tempo de tromboplastina parcial ativada pode detectar falhas nos sistema intrínseco da coagulação (fatores XI, IX, VIII e III) (RAVEL, 1997).

1.2.4 Parâmetros Histopatológicos

A histopatologia constitui uma ferramenta valiosa pois avalia o dano celular e suas conseqüências.

A análise histopatológica inclui a avaliação de processos agudos e crônicos, tais como a inflamação aguda onde as células são lesadas ou mortas e as estruturas vizinhas permanecem intactas e os principais elementos clínicos são a febre, a tumefação e a dor. Nos estudos de efeitos adversos de um composto, a inflamação crônica constitui parâmetro de elevada importância pois as alterações celulares podem ser claramente evidenciadas.

Processos inflamatórios crônicos caracterizam-se por apresentar formação de tecidos de granulação, granulomas com a presença de células gigantes; estas observações são conclusivas da ação tóxica do agente químico em uso. Outro padrão de doença diagnosticável no exame histopatológico é a alergia sendo que, neste caso, a análise revela um infiltrado de eosinófilos e alterações nos tecidos como o espessamento da membrana das células (CULLING; ALLISON; BARR, 1985).

1.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método muito eficiente para a determinação dos níveis plasmáticos da ofloxacina e da minociclina (BOCKER et al., 1991; IMMANUEL; KUMAR, 2001). Métodos simples, precisos, sensíveis e de baixo custo têm sido desenvolvidos para análises dos fármacos componentes do esquema ROM.

Lau, Hanson e Carel (1996) descrevem um método para quantificação de rifampicina, em plasma humano por CLAE, com coluna de extração Bond-Elut C2, e uma coluna de fase reversa Zorbax Rx C8 e detetor ultravioleta visível (UV-VIS), utilizando rifampicina e sulinaco como padrão interno. O sulindaco é um antiinflamatório não esteroideal, que apresenta atividade protetora contra formas radicalares no processo inflamatório e prevenção em processos carcinogênicos (FERNANDES et al., 2003, 2005).

A rifampicina foi analisada em plasma e formulação, utilizando rifapentina como padrão interno, coluna de fase reversa Nova Pak C₁₈ e fase móvel composta por metanol:tampão fosfato de sódio, através de detector U.V., operando em 254nm (SHRUTIDEVI et al., 2004).

Calleja et al. (2004) quantificaram a rifampicina em plasma e fígado de ratos, utilizando uma coluna de fase reversa C₁₈ e fase móvel composta por água:acetonitrila, em detector de arraste de diodo, operando em 333nm.

Smith, Van Dyk e Fredericks (1999) quantificaram simultaneamente, em plasma, a rifampicina, pirazinamida e isonoazida, utilizando uma coluna de extração em fase sólida, e uma mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético como fase móvel, com uma coluna C8 de fase reversa.

Conte, Lin e Zurlinden (2000) quantificaram a rifampicina em plasma humano, fluido broncoalveolar e células alveolares, utilizando uma coluna de fase reversa e diazepam como padrão interno.

Boffito et al. (2002) desenvolveram método simultâneo para quantificação da rifampicina e efavirenz por CLAE otimizando assim os estudos de farmacocinética.

Macek e Ptacek (1995) descreveram um método para determinação de ofloxacina em plasma humano, precipitando proteínas com acetonitrila e utilizando uma coluna C18 de fase reversa, e enoxacina como padrão interno.

Zeng et al. (1999) separaram e quantificaram os enantiômeros da ofloxacina utilizando uma coluna de fase estacionária C18 de fase reversa, em microsomas hepáticos de ratos.

Ali, Ghori e Saeed (2002) desenvolveram método simultâneo para quantificação da ofloxacina, hidrocloreto de tetrahidrozolina e acetato de prednisona em CLAE, com extração em fase sólida.

Mascher (1998) utilizou CLAE, com detetor UV e extração líquido-líquido, para determinar a concentração de minociclina em plasma humano.

Orti et al. (2000) procederam a quantificação de minociclina em plasma e saliva humana, utilizando demeclociclina como padrão interno e uma coluna de fase reversa C8 Nucleosil Oasis HLB.

Colovic e Caccia (2003) quantificaram a minociclina em plasma e cérebro de ratos utilizando CLAE acoplado a um detector U.V., operando em 350nm e coluna de fase reversa RP-8, utilizando como padrão interno tetraciclina e/ou democlociclina.

Considerando que a endemia hansênica continua sendo um sério problema de saúde pública no Brasil, que o esquema ROM, embora se mostre eficaz no tratamento desta doença, está sendo implantado no Brasil de forma gradual e que não existem dados na literatura que evidenciam a correlação entre dose/concentração plasmática e efeitos adversos provocados pela associação da rifampicina, ofloxacina e minociclina, propôs-se o presente trabalho.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar metodologia analítica em cromatografia líquida de alta eficiência para determinação das concentrações plasmáticas da rifampicina, ofloxacina e minociclina, em ratos, e investigar a correlação dose/concentração plasmática versus possíveis efeitos adversos, analisando-se parâmetros bioquímicos, hematológicos, hemostáticos e histopatológicos em ratos machos Wistar, após a administração de rifampicina, ofloxacina e minociclina em regime de dose única e múltipla em esquema de mono e politerapia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Foram utilizados 18 grupos (n=8) de ratos machos jovens, linhagem Wistar, com peso variando entre 220 e 250 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados, em número de seis, em caixas de polipropileno medindo 50 x 35 x 15 cm. As caixas foram colocadas em salas com temperatura ambiente constante (22° a 24° C), mantidas por meio de aparelho de ar condicionado, em ciclo de 12 horas de claro e escuro. Água e comida foram fornecidas “*ad libitum*” durante todo o experimento. Todos os procedimentos com os animais estão de acordo com as normas éticas da Associação Internacional para Estudos da Dor (ZIMMERMANN, 1983).

3.1.2 Via de administração

A via de administração utilizada nos experimentos foi a intraperitoneal. Após a imobilização do animal, coloca-se a agulha paralela à linha da pata e introduz-se na parede abdominal alcançando a cavidade peritoneal. A agulha, quando introduzida longitudinalmente à linha da pata, proporciona injeção segura em área que evita a bexiga urinária no abdômen posterior e o fígado no anterior. Embora seja possível ocorrer o risco de injeção dentro do trato gastrointestinal, isto é uma complicação rara.

Os fármacos foram administrados seguindo o esquema:

3.1.2.1 REGIME DE DOSAGEM: dose única – fármacos isolados

Grupo controle: Para representar o grupo controle administrou-se dimetilsulfóxido (DMSO) em dose única em volume compatível com cada fármaco. Os valores obtidos foram analisados de forma a nos permitir adotar um único grupo controle, com total confiabilidade, atestada por análise estatística.

Rifampicina (RFP)

- Grupo RFP 50mg/kg: 500µL de 50mg/kg de rifampicina em dimetilsulfóxido.
- Grupo RFP 100mg/kg: 500µL de 100mg/kg de rifampicina em dimetilsulfóxido.
- Grupo RFP 200mg/kg: 500µL de 200mg/kg de rifampicina em dimetilsulfóxido.

Ofloxacina (OFLX)

- Grupo OFLX 40mg/kg: 200µL de 40mg/kg de ofloxacina em dimetilsulfóxido.
- Grupo OFLX 80mg/kg: 200µL de 80mg/kg de ofloxacina em dimetilsulfóxido.
- Grupo OFLX 160mg/kg: 200µL de 160mg/kg de ofloxacina em dimetilsulfóxido.

Minociclina (MINO)

- Grupo MINO 10mg/kg: 200µL de 10mg/kg de minociclina em dimetilsulfóxido.
- Grupo MINO 20mg/kg: 200µL de 20mg/kg de minociclina em dimetilsulfóxido.
- Grupo MINO 40mg/kg: 200µL de 40mg/kg de minociclina em dimetilsulfóxido.

3.1.2.2 REGIME DE DOSAGEM: dose única – fármacos associados

(rifampicina+ofloxacina+minociclina) ROM

- Grupo ROM I: 50mg/kg de rifampicina associada a 40mg/kg de ofloxacina e a 10mg/kg de minocilina em 900µL de dimetilsulfóxido.
- Grupo ROM II: 100mg/kg de rifampicina associada a 80mg/kg de ofloxacina e a 20mg/kg de minocilina em 900µL de dimetilsulfóxido.
- Grupo ROM III: 200mg/kg de rifampicina associada a 160mg/kg de ofloxacina e a 40mg/kg de minocilina em 900µL de dimetilsulfóxido.

3.1.2.3 REGIME DE DOSAGEM: doses múltiplas – fármacos isolados

Grupo controle: Para representar o grupo controle administrou-se dimetilsulfóxido (DMSO) durante quatro dias consecutivos em volume compatível com cada fármaco. Os valores obtidos foram analisados de forma a nos permitir adotar um único grupo controle, atestado por análise estatística.

Rifampicina (RFP)

- Grupo RFP 100mg/kg: 500µL de 100mg/kg de rifampicina em dimetilsulfóxido, durante quatro dias consecutivos.

Ofloxacina (OFLX)

- Grupo OFLX 80mg/kg: 200µL de 80mg/kg de ofloxacina em dimetilsulfóxido, durante quatro dias consecutivos.

Minociclina (MINO)

- Grupo MINO 20mg/kg: 200µL de 20mg/kg de minociclina em dimetilsulfóxido, durante quatro dias consecutivos.

3.1.2.4 REGIME DE DOSAGEM: doses múltiplas – fármacos associados

(rifampicina100+ofloxacina80+minociclina20) ROM II

- Grupo ROM II: 100mg/kg de rifampicina associada a 80mg/kg de ofloxacina e a 20mg/kg de minocilina em 900µL de dimetilsulfóxido, administrados durante quatro dias consecutivos.

3.1.3 Grupos controle para histopatologia – grupo H₂O

- Grupo controle água destilada: animais que receberam água destilada nos mesmos esquemas de dosagem utilizados.

3.1.4 Coleta de Material

Devido a necessidade de coletar uma quantidade relativamente grande de sangue, não realizou-se a coleta diária pela veia caudal, como muitos estudos descrevem. Escolheu-se a aorta, de onde coletou-se uma maior quantidade de sangue e distribuição do mesmo em diferentes tubos: tubos de vidro para posterior separação do soro e tubos de plástico, com anticoagulante, para obtenção do sangue total e, posteriormente, do plasma. Como anticoagulantes foram usados heparina, citrato de sódio e EDTA sódico (ácido tetracético d-etilenodiamino). A obtenção do plasma e soro foram realizadas através da centrifugação das amostras a 3000 r.p.m. durante 15 minutos. As amostras de soro e plasma foram separadas dos elementos figurados em um período de tempo inferior a duas horas após a colheita do sangue e conservadas em geladeira até o momento da análise. Todas as análises bioquímicas e hematológicas foram realizadas no mesmo dia da colheita do material. As amostras de plasma referentes ao controle terapêutico da rifampicina, ofloxacina e minociclina foram armazenadas a -20°C por um período não superior a 15 dias.

Para a análise histopatológica do fígado, o órgão foi obtido cirurgicamente, limpo e imerso em ALFAC (álcool 80%:formol:ácido acético/ 85:10:5), durante 48h, em seguida substituída por álcool 70°, para posterior inclusão em parafina (BEHMER; CASTRO DE TOLOSA; FREITAS NETO, 1976). Para a avaliação histométrica foram realizadas técnicas morfométricas (cariometria) e estereológicas, padronizadas no Departamento de M.E.F. da FORP-USP.

Para a obtenção de sangue e tecidos, os ratos foram anestesiados com éter etílico, e a colheita do material foi realizada 2 horas após a administração dos fármacos, tempo este padronizado adotando-se a meia-vida biológica dos mesmos, de forma a permitir dados confiáveis a concentração plasmática e entre os parâmetros avaliados. Os animais foram eutanasiados logo em seguida da colheita do material.

3.1 MÉTODOS

3.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) desenvolvida para análise da rifampicina, ofloxacina e minociclina em plasma de ratos.

3.2.1.1 Análise da rifampicina em plasma de ratos por CLAE

A) Soluções padrões e reagentes

As soluções da rifampicina foram preparadas em metanol grau cromatografia (J.T. Baker[®] HPLC, *Mallinckrodt Baker*, Inc., EUA). As soluções-estoque de rifampicina (*USP*) foram preparadas na concentração de 2mg/mL, diluídas em metanol para obter as concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200µg/mL em plasma e estocadas a -4°C em tubos de vidro protegidos da luz. Foram utilizadas solução-estoque de sulindaco (*Sigma*) (padrão interno) na concentração de 50µg/mL e solução aquosa de ácido ascórbico na concentração de 1mg/mL. As soluções da curva e amostras foram tratadas com metanol grau cromatografia (J.T. Baker[®] HPLC, *Mallinckrodt Baker*, Inc., EUA) para precipitação protéica. O tampão acetato 0,25mol L⁻¹ foi preparado utilizando acetato de sódio e ácido acético grau p.a. (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). Os solventes usados na preparação da amostra e como constituintes da fase móvel foram grau cromatografia (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). A água usada no tampão foi purificada no sistema Milli-Q. A fase móvel foi filtrada em membranas de 0,45µm (Millipore[®]) degaseificada em ultra-som T 50 (Thornton-*Inpec Eletrônica LTDA.*, Brasil) e bomba a vácuo (Marconi, *Art. Lab.*, Brasil) acoplado em sistema de filtração Ultra-Ware (Millipore[®]). O pH da fase móvel foi ajustado para 3,0 no pHmetro VWR Scientific modelo 8005 (*ATI Orion Research*, EUA).

B) Análise Cromatográfica

Utilizou-se um equipamento para cromatografia a líquido Shimadzu - modelo LC-10AS equipado com injetor “*Rheodyne*” modelo 7125, amostrador de 20µL, detector de absorbância no ultravioleta visível (UV-VIS) (*Shimadzu* modelo SPD-10A) operando em 254nm utilizando uma coluna de fase reversa (C8, **LiChrocart® 100 - Merck** - 125 x 4 mm, partículas de 5 µm). A fase móvel usada foi tampão acetato 0,25mol L⁻¹ pH=3,0 e metanol (40:60 v/v), com vazão de fase móvel de 1mL/min. Os cromatogramas foram obtidos com o integrador *Shimadzu*–C–R6A chromatopac.

C) Preparação da amostra

Adicionou-se em 0,2mL de plasma, 25µL de padrão interno (sulindaco), 25µL da solução-padrão, 50µL de ácido ascórbico e 300µL de metanol para promover a precipitação protéica. As amostras acondicionadas em “eppendorfs” de 1,5mL foram submetidas ao mixer por 1 minuto e centrifugadas a 1130g por 3 minutos, injetando-se 20µL do sobrenadante no equipamento para cromatografia (Figura 5).

Figura 5. Procedimento de precipitação protéica e análise cromatográfica da rifampicina em plasma de ratos

3.2.1.2 Análise simultânea da ofloxacina e da minociclina em plasma de ratos por CLAE

A) Soluções padrões e reagentes

Foram preparadas as seguintes soluções:

- Soluções-estoque de ofloxacina (*Janssen-Cilag*) e minociclina (*Stiefel*) na concentração de 1mg/mL, diluídas em metanol grau cromatografia (J.T. Baker[®] HPLC, *Mallinckrodt Baker*, Inc., EUA) para obter as concentrações de 0,5, 2,0, 5,0, 10 e 20µg/mL para a minociclina, e 0,5, 2,0, 5,0, 10, 20 e 40µg/mL para a ofloxacina sendo estocadas a -4°C em tubos de vidro protegidos da luz.

- Tampão fosfato 0,5mol L⁻¹ pH=6,9, utilizando fosfato dissódico e monossódico grau p.a. (*Merck*, S.A., Brasil) e o cloreto de sódio (*Merck* S.A., Brasil) grau p.a..

- Tampão fosfato 0,5mol L⁻¹ pH = 3,0, utilizado como constituinte da fase móvel, foi preparado utilizando fosfato dissódico e monossódico grau p.a. (*Merck*, S.A., Brasil) e 1,5mL de ácido orto fosfórico 85% (*Merck* S.A., Brasil) para ajuste de pH. Os solventes usados na preparação da amostra assim como os constituintes da fase móvel (clorofórmio e acetonitrila, respectivamente) foram grau cromatografia (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). A água usada no tampão foi purificada no sistema Milli-Q. A fase móvel foi filtrada em membranas de 0,45µm (Millipore[®]) e degaseificada em ultra-som T 50 (*Thornton-Inpec Eletrônica LTDA.*, Brasil) e bomba a vácuo (*Marconi, Art. Lab.*, Brasil) acoplado em sistema de filtração Ultra-Ware (Millipore[®]). Para ajuste de pH dos tampões utilizados, utilizou-se pHmetro VWR Scientific modelo 8005 (*ATI Orion Research*, EUA).

B) Análise Cromatográfica

Foi utilizado um equipamento para cromatografia a líquido Shimadzu - modelo LC-10AS equipado com injetor “*Rheodyne*” modelo 7125, amostrador de 20µL, detector de absorbância no UV-VIS (*Shimadzu* modelo SPD-10A) operando em 280nm a coluna de fase

reversa (RP-18, **LiChrocart®- Merck** - 125 x 4 mm, partículas de 5µm). A fase móvel usada foi tampão fosfato 0,5mol L⁻¹ pH=3,0 e acetonitrila (87:13 v/v), com vazão de fase móvel de 1mL/min. Os cromatogramas foram obtidos com o integrador *Shimadzu-C-R6A* chromatopac.

C) Preparação da amostra

Foram adicionados em 0,5mL de plasma, 200µL de tampão fosfato 0,5mol L⁻¹ pH=6,9, agitados em mixer durante 1min., 25µL da solução padrão de ofloxacina e minociclina e 100mg de NaCl, e novamente agitados durante 1min. em mixer. Adicionou-se 5mL de clorofórmio como solvente extrator. Os tubos de extração permaneceram 30 minutos em agitador mecânico horizontal. Centrifugou-se a 1800g por 10 minutos e 4,0mL de fase orgânica foram submetidos 30min. no evaporador de amostras (Jouan-RCT90/RC10-22), concentrando as mesmas para 1mL, armazenadas em geladeira a 4°C, submetendo-as posteriormente a evaporação do solvente, sob corrente de ar, em temperatura ambiente. Os resíduos foram ressuspensos em 100µL de fase móvel, agitados em mixer por 1 minuto, centrifugados e injetados 20µL (Figura 6).

Figura 6. Procedimentos de extração e análise cromatográfica da ofloxacina e minociclina em plasma de ratos

3.2.2 Validação das metodologias analíticas

A validação de métodos analíticos constitui um procedimento fundamental para verificar se o método desenvolvido é adequado para o uso pretendido e para garantir a confiabilidade dos dados produzidos. Com isso, parâmetros analíticos específicos são determinados com respeito à curva de calibração, recuperação, linearidade, precisão intra e interensaios limite de quantificação e estabilidade.

3.2.2.1 Curva de calibração

A curva de calibração define adequadamente a relação que existe entre as concentrações das amostras analisadas e a resposta obtida pelo equipamento. Para construirmos uma curva de calibração é necessária a análise cromatográfica de 5 a 8 amostras submetidas ao método de extração proposto. As concentrações dos padrões devem ser escolhidas com base nas concentrações esperadas no estudo realizado. Em seguida, são calculadas as equações de regressão linear ($y = ax + b$) e os coeficientes de determinação (r^2). Coeficiente de correlação igual a 1, indica correlação perfeita entre x e y, enquanto coeficiente igual a 0 indica não haver correlação entre esses valores.

A) Rifampicina

Para a construção das curvas de calibração para a rifampicina, 25µL de cada uma das soluções padrão descritas no item 3.2.1.1(A) foram submetidas aos procedimentos de precipitação proteica e análise cromatográfica descritos no item 3.2.1.1 (B e C).

A regressão linear foi obtida plotando-se as concentrações plasmáticas no eixo da abcissas (X) e a relação da altura dos picos obtidos pelo padrão interno no eixo das ordenadas (Y).

B) Ofloxacina e Minociclina

Para a construção das curvas de calibração para a ofloxacina e minociclina, 25µL de cada uma das soluções padrão descritas no item 3.2.1.2(A) foram submetidas aos procedimentos de extração e análise cromatográfica descritos no item 3.2.1.2 (B e C).

A regressão linear foi obtida plotando-se as concentrações plasmáticas no eixo da abcissas (X) e a relação da altura dos picos obtidos no eixo das ordenadas (Y).

3.2.2.2 Linearidade

Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação de primeira ordem, ou seja, linear, é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) da substância nas amostras, podendo ser descrita pela equação de regressão linear: $y = a x + b$, onde a é a inclinação da reta e b é a intersecção da curva no eixo y (PENG; CHIOU, 1990). A linearidade corresponde a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada dentro de uma determinada faixa (SWARTZ; KRULL, 1998).

Segundo as normas do Center for Drug Evaluation and Research (UNITED STATES, 1998) aceita-se valores de r^2 maiores que 0,95, contudo em nossos ensaios foram consideradas lineares, curvas com r^2 maior que 0,98 (CHASIN et al., 1998). As linearidades dos métodos foram obtidas de forma idêntica a da curva de calibração, estendendo-se a faixa de concentração até 400µg/mL para a rifampicina, 80µg/mL para ofloxacina e 40µg/mL para a minociclina.

3.2.2.3 Precisão e Exatidão

A precisão de um método analítico é a medida do erro randômico e é definida como a concordância entre o resultado das replicatas de uma mesma amostra. É expressa em porcentagem do coeficiente de variação ou desvio padrão relativo das medidas das replicatas (CAUSON, 1997).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados obtidos e um valor aceito como referência (SWARTZ; KRULL,1998). A exatidão é melhor expressa como porcentagem de erro sistemático.

A precisão e exatidão do método de análise da rifampicina foram verificadas através de estudos intra e interensaios. Foram avaliadas três concentrações, alta, média e baixa (10, 50 e 100µg/mL).

A precisão e exatidão do método de análise simultâneo da ofloxacina e minociclina foram verificadas através de estudos intra e interensaios. Foram avaliadas três concentrações, alta, média e baixa (2, 5 e 10µg/mL).

Na precisão intra-ensaio foram analisadas dez alíquotas (n = 10) de uma mesma amostra dentro de um dia, para cada concentração. Na precisão interensaio, foram considerados os resultados das análises de cinco alíquotas diferentes realizadas em cinco dias consecutivos (n=5), em duplicata para cada concentração. As concentrações dos fármacos nas amostras analisadas foram determinadas empregando-se curvas de calibração preparadas diariamente.

O valor numérico usado para quantificar a precisão é o coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo:

$$CV = [S / K] \times 100$$

Onde S = desvio padrão e K = valor médio da relação [altura padrão/ altura padrão interno/ concentração do padrão]

A exatidão intra e interensaio também foram avaliadas utilizando os resultados experimentais obtidos na precisão. A exatidão foi expressa em porcentagem de erro sistemático:

$$\% \text{ de erro sistemático} = [\text{valor obtido} - \text{valor real} / \text{valor real}] \times 100$$

3.2.2.4 Recuperação

A recuperação de um método analítico é melhor estabelecida pela comparação da resposta de uma amostra extraída, em concentrações altas, médias e baixas, com outras não extraídas representando 100% de recuperação (CAUSON, 1997).

Para os cálculos, na recuperação absoluta é necessário corrigir o volume de solvente recuperado para o volume de solvente adicionado. Na recuperação absoluta, o padrão interno, quando usado, é adicionado à fase orgânica após o procedimento de extração.

Embora recuperações próximas a 100% sejam desejáveis, a extensão da recuperação de um analito pode ser aceita até na ordem de 50 – 60 %, se a recuperação for precisa, exata e reprodutível (CHASIN et al., 1998).

Para as metodologias apresentadas, foram avaliadas as recuperações absolutas de cada substância. A recuperação da rifampicina foi obtida através da construção de uma curva com quatro concentrações (10, 50, 100 e 200µg/mL), como descrito no item 3.2.1.1(C). As amostras de plasma contendo as quatro concentrações citadas da rifampicina, foram analisadas, em duplicatas, após a realização da precipitação protéica nas mesmas.

A porcentagem de recuperação foi calculada dividindo-se a resposta da curva extraída pela resposta da curva não extraída (curva seca) e multiplicando este valor por 100.

A recuperação da ofloxacina e minociclina foi calculada de forma idêntica construindo-se uma curva com quatro concentrações (0,5, 2, 5 e 10µg/mL), em duplicata, ou seja, 25 µL das soluções de ofloxacina e minociclina foram adicionadas a um tubo cônico com 0,2mL de clorofórmio, submetendo a agitação por 1min., acondicionando-os em geladeira, secando um a um em fluxo de ar e injetando 20µL no cromatógrafo. A seguir, amostras de plasma contendo concentrações de 0,5, 2, 5 e 10µg/mL da ofloxacina e da minociclina foram analisadas, em duplicatas, após ter sido efetuado o procedimento de extração como descrito no item 3.2.1.2 (C).

3.2.2.5 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a mais baixa concentração da substância analisada que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade (SWARTZ; KRULL, 1998). Para o LQ ser aceito, ele deve apresentar precisão e exatidão de até 20 %, e deve ser pelo menos cinco vezes maior que algum interferente com mesmo tempo de retenção presente na amostra branca.

Para se determinar essa concentração, foram construídas curvas de calibração para cada analito como descrito nos itens 3.2.1.1, 3.2.1.2, incluindo-se concentrações menores de rifampicina (0,5-1,0 μ g/mL), ofloxacina (0,125-0,250 μ g/mL) e minociclina (0,125-0,250 μ g/mL).

O limite de quantificação foi considerado como a menor concentração que forneceu precisão e exatidão com erro menor que 20 %, segundo definição de Pommier, Sioufi e Godbillon (1997).

3.2.2.6 Especificidade

A especificidade pode ser definida como a habilidade do método em distinguir o analito de todas as outras substâncias presentes na amostra. Isto pode ser estabelecido pela comparação do tempo de retenção cromatográfico do analito com outras substâncias. Se houver algum interferente na amostra, ele deve ser 1/5 do limite de quantificação (CAUSON, 1997). Havendo coincidência nos tempos de retenção, o interferente é submetido ao procedimento de extração e então reanalisado.

A especificidade do método foi verificada avaliando-se outros fármacos que poderiam estar presentes nas amostras dos animais. Para tanto, alíquotas de solução-padrão correspondentes às concentrações plasmáticas destes fármacos foram adicionadas a um tubo cônico e o solvente evaporado até a secura. Após a dissolução do resíduo na fase móvel, os possíveis interferentes foram analisados.

3.2.27 Estabilidade

A estabilidade de fármacos e outras substâncias em fluidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e das condições de acondicionamento utilizadas.

As determinações de estabilidade devem utilizar amostras preparadas a partir de uma solução estoque recente da substância em análise, adicionada a uma matriz biológica isenta de interferência.

Para os estudos de estabilidade, brancos de plasma foram adicionados de soluções padrão para obtenção de amostras nas concentrações de 50µg/mL para a rifampicina e 10µg/mL de plasma para a ofloxacina e minociclina.

Alíquotas de 200µL de plasma enriquecido com rifampicina e alíquotas de 500µL de plasma enriquecido com ofloxacina e minociclina foram armazenadas a -20°C até a análise.

As alíquotas foram analisadas durante sete dias consecutivos, a cada quinzena, durante duas quinzenas consecutivas e a cada mês, durante três meses consecutivos.

3.2.3 *Determinação dos parâmetros bioquímicos, hematológicos, hemostáticos e histopatológicos*

3.1.3.1 Parâmetros Bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos analisados no presente trabalho foram quantificados por técnicas analíticas automatizadas utilizando o auto-analisador ABBA-VP, da marca Abbott.

Os parâmetros bioquímicos determinados foram:

- Bilirrubina total e direta pelo método colorimétrico, segundo Sims e Horn (1958), utilizando reagentes da marca Labtest. Nesta metodologia toda a bilirrubina presente na amostra sérica reage com o diazo-reagente na presença de um acelerador (solubilizador), no caso a mistura benzoato/caféina. Desta forma obtém-se o parâmetro bilirrubina total, que é a soma das frações glicuronídicas (direta) e ligada à albumina (indireta). Quando a amostra é colocada em contato com o diazo-reagente na ausência do acelerador somente a fração mais

hidrossolúvel reage isto é, somente os glicuronídeos de bilirrubina reagem formando o produto colorido cuja intensidade de cor é proporcional a concentração de bilirrubina conjugada na amostra constituindo assim o parâmetro bilirrubina direta (KAPLAN; PESCE, 1996).

- Fosfatase alcalina (ALP) pelo método cinético-enzimático otimizado utilizando-se reagentes da marca Labtest. A fosfatase alcalina atua sobre um substrato fosforilado, liberando o grupamento fosfato, ficando o substrato, inicialmente incolor, na sua forma aniônica colorida. (BISHOP; DUBEN-ENGELKIRK; FODY, 2000; BOWERS; DUBEN-ENGELKIRK; FODY, 2000).

- Aspartato-aminotransferase (AST) e Alanina-aminotransferase (ALT) pelo método cinético-enzimático otimizado, através de reagentes da marca Labtest. A AST transfere grupos amínicos do aspartato formando oxalacetato, que na presença da enzima malato-desidrogenase (MDH), oxida o NADH a NAD^+ , provocando a diminuição da absorbância da solução. A diminuição da absorbância é proporcional à concentração da enzima na amostra desde que os outros fatores da velocidade de ação enzimática estejam sob controle. A ALT é determinada da mesma forma, mudando-se apenas o substrato inicial, aspartato para alanina, e a enzima da segunda etapa reacional, MDH para lactato-desidrogenase (LDH) (BISHOP; DUBEN-ENGELKIRK; FODY, 2000; HENRY et al., 1960).

- Gama-glutamiltransferase (GGT) pelo método cinético-enzimático, utilizando-se reagentes da marca Labtest. A GGT catalisa a transferência de grupamento glutamyl de um substrato específico, a glutamyl-p-nitroanilina, para um aceptor de glutamyl. A p-nitroanilina livre do grupamento glutamyl apresenta coloração específica sendo o incremento da absorbância proporcional a atividade da GGT. Como os outros fatores que influenciam na velocidade de ação enzimática estão sob controle, esta atividade é proporcional a

concentração da enzima na amostra (BISHOP; DUBEN-ENGELKIRK; FODY, 2000; SZASZ, 1969).

- Uréia pelo método cinético-enzimático, por meio de reagentes da marca Labtest. De acordo com esta metodologia, a urease desdobra a uréia em gás carbônico e amônia. A amônia formada reage com o cetoglutarato, consumindo NADH. O consumo de NADH implica na diminuição da absorbância da solução a 340nm sendo a diminuição proporcional à concentração de uréia na amostra (GUTMANN; BERGMEYER, 1974; KAPLAN; PESCE, 1996).

- Creatinina pelo método cinético-colorimétrico, por meio de reagentes da marca Labtest. A creatinina do soro reage com o picrato em meio alcalino produzindo um cromógeno vermelho-alaranjado cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de creatinina na amostra. Na verdade, nos primeiros segundos da reação, somente os interferentes do soro reagem com o picrato produzindo cromógenos, cuja absorbância é obtida numa leitura, todo o aumento de cor pode ser atribuído à reação da creatinina com o picrato. Ao final de cinco minutos, é realizada uma segunda leitura que corresponde à absorbância total dos cromógenos formados (de creatinina e interferentes). Deste total subtrai-se a leitura inicial referente aos interferentes obtendo-se assim a creatinina verdadeira (KAPLAN; PESCE, 1996).

- Proteínas totais pelo método colorimétrico do biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949) e albumina pelo método colorimétrico do verde-bromocresol (DOUMAS; WATSON; BIGGS, 1971), utilizando reagentes da marca Labtest. Todas as proteínas apresentam ligações peptídicas entre seus aminoácidos constituintes. Esta ligação representa o ponto reacional mais importante das proteínas. É devido a presença destas ligações peptídicas que as proteínas são capazes de formar complexos coloridos com íons Cu^{++} , cuja intensidade de cor produzida é proporcional à concentração de proteínas na amostra. A interação entre albumina e o verde-bromocresol (VBC) provoca a alteração da cor amarela deste agente

indicador, para a cor verde, no chamado “erro protéico do indicador”. A intensidade desta coloração verde é proporcional a concentração de albumina na amostra (KAPLAN; PESCE, 1996; MILLER; GONÇALVES, 1999).

- Amilase pelo método CNPG3 (KAPLAN; PESCE, 1996), por meio de reagentes da marca Labtest. A α -amilase hidrolisa o substrato 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriose (CNPG3), liberando 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) e formando 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltoside (CNPG2), maltotriose (G3) e glicose (G). A velocidade de formação de 2-cloro-4-nitrofenol pode ser medida fotometricamente e proporciona uma medida direta da atividade da α -amilase na amostra.

3.2.3.2 Parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos foram realizados através de técnicas manuais consagradas pelo uso, no laboratório de Hematologia Clínica.

Foram avaliados os seguintes parâmetros hematológicos utilizando metodologias clássicas:

- Número global de eritrócitos, em câmara de Neubauer, utilizando como diluidor líquido de Hayem;
- concentração de hemoglobina pelo método da cianometaemoglobina; volume de células empacotadas ou hematócrito pelo método do microhematócrito;
- Cálculo dos índices eritrocitométricos (Volume Corpuscular Médio, Hemoglobina Corpuscular Média e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média);
- Exame da morfologia eritrocitária e contagem diferencial de leucócitos em extensão sangüínea corada por Leishman;
- Contagem de leucócitos, em câmara de Neubauer, utilizando como diluidor o líquido de Turk.

3.2.3.3 Parâmetros Hemostáticos

Para a avaliação do sistema hemostático foram executadas as seguintes determinações:

- Determinação do Tempo de Protrombina (TP) – avalia o sistema extrínseco da coagulação, pelo método da tromboplastina cálcica anti-heparina (QUICK, 1938), utilizando-se reagentes Biolab/Biomérieux;
- Determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) – avalia o sistema intrínseco da coagulação, pelo método da cefalina ativada (BELL; ALTON, 1954), utilizando-se reagentes Biolab/Biomérieux.

Tais determinações foram realizadas com *Quick Timer – analisador de coagulação microprocessado*, que possui sistema de detecção turbodensitométrico, para fatores de coagulação (TP – resultados em atividade (%); e TTPA-resultados em tempo (s)).

3.2.3.4 Técnica Histológica

As análises histopatológicas foram realizadas em fragmentos do lobo direito do fígado. Tais amostras foram cortadas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados de 6µm de espessura e a técnica de coloração empregada foi a técnica de hematoxilina e eosina. A observação microscópica foi realizada em um aumento de 900X.

3.2.3.4 Técnica Morfométrica

3.2.3.5.1 Cariometria

Tem como finalidade avaliar morfometricamente os núcleos dos hepatócitos dos animais dos grupos experimentais. Para tanto, os cortes foram focalizados em microscópio de luz NIKON, com objetiva de imersão (100X) munido de câmara clara. Os núcleos em número de 50 por amostra foram projetados sobre papel, com aumento final de 1000 vezes, e contornados com lápis número 2.

Posteriormente, foram medidos os diâmetros maior (D) e menor (d) dos núcleos com auxílio de papel milimetrado transparente. Estes dados foram introduzidos em um programa para microcomputador desenvolvido no Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto- USP. Foram analisados os seguintes parâmetros nucleares (SALA et al., 1994):

- Diâmetro médio: $M = (D.d)^{1/2}$
- Relação entre diâmetros: D / d
- Perímetro: $P = (\pi / 2) \cdot [1,5 \cdot (D + d) - M]$
- Área: $A = \pi \cdot M^2 / 4$
- Volume: $V = 6^{-1} \cdot \pi \cdot M^3$
- Relação entre volume e área: $V / A = 2 / 3 \cdot M$
- Coeficiente de forma: $F = 4 \cdot \pi \cdot A / P^2$
- Índice de contorno: $I = P / (A)^{1/2}$
- Excentricidade: $E = (D + d)^{1/2} \cdot (D - d)^{1/2} / D$

3.2.3.5.2 Estereologia

As determinações estereológicas nos hepatócitos foram realizadas em desenhos obtidos por projeções dessas células com câmara clara (Jena) onde está impresso o sistema teste de Merz (1968). Com a finalidade de avaliar a relação núcleo-citoplasma, os volumes citoplasmático e celular e o número de células por milímetro cúbico (densidade numérica) dos hepatócitos, foi utilizada a contagem de pontos (2000 por amostra, correspondentes ao produto de 20 campos por 100 pontos da grade) e aplicados às equações estereológicas apropriadas.

A grade de MERZ, que foi utilizada para contar o número de pontos sobre as estruturas histológicas, consiste em um quadrado de $1440 \mu\text{m}^2$, que limita uma área teste contendo um sistema de 100 pontos, com uma distância real entre os pontos de $12,48 \mu\text{m}$ marcados sobre 10 linhas sinuosas, formadas por uma sucessão de 10 semicírculos encadeados por linha, conforme figura 7. Os cortes foram focalizados ao microscópio de luz, com objetiva de 100X, munido de câmara clara. As imagens obtidas do fígado foram desenhadas sobre a grade.

A grade de MERZ pode ser usada tanto para contar pontos sobre determinada estrutura histológica, como para contar intersecções entre duas estruturas contíguas, bastando para isso considerar o número de pontos que caem sobre a estrutura em estudo, no primeiro caso, ou o número de vezes em que as superfícies vizinhas cortam a linha curva, no segundo caso.

Figura 7. Representação gráfica da grade idealizada por Merz (1968)

Foram estimados os seguintes parâmetros nos hepatócitos, conforme Sala, Lopes e Matheus (1992):

a) Relação núcleo / citoplasma: é dada pela relação entre os volumes relativos do núcleo e do citoplasma, expressa pela equação:

$$NC = V_{vn} / V_{vcit}$$

Os volumes relativos são determinados pelo número de pontos que incidem sobre as estruturas consideradas, em relação ao número total de pontos contidos na área teste (CHALKLEY, 1943; WEIBEL, 1969).

O valor obtido é uma sobrestimação do valor real, devido ao chamado “efeito Holmes” (WEIBEL, 1969), que decorre de uso de cortes histológicos com espessura finita. Essa sobrestimação pode ser corrigida, levando-se em consideração o tamanho da estrutura envolvida e a espessura do corte histológico. Henning (1957) propôs a seguinte equação para correção do efeito Holmes, considerando os núcleos como esferas de diâmetro médio D , sendo T a espessura do corte:

$$V_{vc} = \frac{V_{vn}}{1 + 3T / 2D}$$

Nessa expressão V_{vc} é a fração volumétrica corrigida dos núcleos, e V_{vn} é a fração volumétrica observada, calculada pela divisão do número de pontos que incidem sobre os núcleos pelo número total de pontos que recaem sobre o núcleo e sobre o citoplasma. O valor do diâmetro médio (D) é o mesmo já determinado previamente, com o emprego da cariometria.

A relação núcleo-citoplasma corrigida será, então:

$$N / C \text{ corrigida} = \frac{V_{vc}}{1 - V_{vc}}$$

Sendo $1 - V_{vc}$ a fração volumétrica citoplasmática corrigida (V_{vcit}).

b) Volume Citoplasmático e Volume celular médios

O volume citoplasmático (V_{ct}) foi estimado a partir do volume nuclear e da relação núcleo / citoplasma corrigida. Por sua vez, a soma dos volumes nuclear e citoplasmático forneceu o valor estimado para a célula “média” (SALA; LOPES; MATHEUS, 1992).

$$V_{ct} = \frac{V_n}{N / C \text{ corrigida}}$$

O volume da celular “médio” é dado pela equação:

$$V_{cel} = V_n + V_{ct}$$

c) Densidade Celular: A densidade celular dos hepatócitos, que corresponde ao número de células por mm^3 de tecido, foi determinada dividindo-se o volume relativo (V_v) das células em questão, pelo volume celular médio (V_{cel}) (SALA; LOPES; MATHEUS, 1992):

$$N_v = (V_v / V_{cel}) \cdot 10^9$$

O fator 10^9 é usado para expressar os resultados em número por mm^3 ; uma vez que os volumes médios das células estão expressos em μm^3 ($10^9 \mu\text{m}^3 = 1\text{mm}^3$).

Análise Estatística

As variáveis bioquímicas, hematológicas e de concentração plasmática dos fármacos, sendo de natureza contínua, foram comparadas entre grupos de interesse, conforme suas médias. Tais grupos compõem-se por um grupo controle e doze (dose única) ou quatro (doses múltiplas) outros grupos de tratamento. Estas comparações foram feitas conforme as médias das variáveis entre os grupos, por modelos lineares generalizados (McCULLAGH; NELDER, 1990). As distribuições das variáveis, foram descritas graficamente por *box-plots*, que indicaram situações onde os dados apresentaram grande assimetria. Nestas situações, os modelos lineares generalizados foram ajustados conforme dados com distribuição de probabilidade gama, o que seria mais apropriado para variáveis com distribuição assimétrica e assumindo valores maiores que zero. Quando os dados apresentaram simetria, os modelos assumiram distribuição normal. Uma análise de resíduos foi utilizada para diagnosticar se os modelos foram corretamente ajustados.

Os modelos lineares generalizados, neste trabalho, podem ser vistos como extensões da análise de variância (ANOVA), com duas vantagens. A primeira vantagem é que os modelos lineares generalizados permitem comparar uma variável entre grupos, ainda que a variância não seja homogênea entre estes grupos. Por outro lado, a ANOVA tem por pressuposto que a variável de interesse tenha variâncias semelhantes em todos os grupos. A variância pode ser visualizada na altura de cada *box-plot*; estas figuras podem mostrar *box-plots* com alturas

bastante variáveis. A segunda vantagem dos modelos lineares generalizados é que estes não exigem que os dados tenham distribuição normal para que as inferências sejam fidedignas. Muitas variáveis de interesse tratam de dados bastante assimétricos assumindo valores maiores que zero, o que permitiu ajuste de modelos com distribuição gama. A interpretação dos modelos lineares generalizados é análoga à da ANOVA.

A análise dos dados deste estudo, ainda que se tratando de variáveis com distribuições assimétricas em alguns casos, não foi conduzida por métodos não-paramétricos. Testes não paramétricos para comparações entre grupos, como o teste de Kruskal-Wallis, não têm um bom desempenho quando são comparados cinco ou mais grupos. Entretanto, os modelos lineares generalizados não foram adequados na análise da variável “bastonete”, devido a esta variável apresentar um grande número de frequências iguais a zero. Como uma única exceção, aplicou-se um teste de Kruskal-Wallis, ainda que este procedimento também apresente alguma limitação nesta análise.

Para análise dos resultados histopatológicos, assim como para os diversos cálculos matemáticos envolvidos nos estudos morfométricos dos dados, foram utilizados diversos programas para computador em linguagem BASIC AVANÇADO (BÁSICA) desenvolvidos pelos Professores Doutores Geraldo Maia Campos e Miguel Angel Sala di Matteo, do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, visando o processamento dos dados experimentais. Uma vez verificado que a distribuição dos dados não era normal, optou-se pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney (CONOVER, 1999).

Em todos os testes de hipóteses envolvidos na análise estatística dos dados foi fixado um nível de significância de 5%. Utilizou-se para o ajuste dos modelos lineares generalizados o programa SAS versão 8 e, para os testes de Mann-Whitney, o programa InStat.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização e validação dos métodos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.1.1 Análise da rifampicina em plasma de ratos por CLAE

4.1.1.1 Cromatogramas referentes à metodologia analítica de análise da rifampicina em plasma de ratos.

Figura 8. Cromatogramas referentes à análise cromatográfica da rifampicina. A) Plasma Branco; B) Plasma adicionado com o padrão (50µg/mL)(tR=tempo de retenção em minutos. tR=6,445 min. para rifampicina e tR=4,465 min. para padrão interno sulindaco); C) Plasma de rato tratado com 50mg/Kg de rifampicina (tR=tempo de retenção em minutos. tR=6,515 min. para rifampicina e tR= 4,49 min. para padrão interno sulindaco)

4.1.1.2 Curva de calibração e curva de Linearidade referente ao método de análise da rifampicina em plasma de ratos por CLAE.

Figura 9. Curva de calibração (A) e linearidade de 0,5 a 400µg/mL (B) referente ao método de análise da rifampicina em plasma de ratos

4.1.1.3 Precisão e Exatidão referente ao método de análise da rifampicina em plasma de ratos por CLAE.

Tabela 1 - Precisão e exatidão do método desenvolvido para análise rifampicina em plasma

Concentração real	Concentração obtida (µg/mL)	Precisão (CV, %)	Exatidão (% de erro)
Intra-ensaio (n = 10)			
10µg/mL plasma	9,16	7,51	8,35
50µg/mL plasma	55,22	1,75	10,45
100µg/mL plasma	97,86	1,93	2,13
Interensaio (n = 5)			
10µg/mL plasma	9,56	6,28	4,33
50µg/mL plasma	51,98	5,62	3,97
100µg/mL plasma	99,23	7,14	0,77

CV = coeficiente de variação.

4.1.1.4 Recuperação referente ao método de análise da rifampicina em plasma de ratos por CLAE.

Tabela 2 - Resultados obtidos na avaliação da recuperação do método desenvolvido

Concentração plasmática (µg/mL)	Recuperação Absoluta (%)
10	91,80
50	81,93
100	85,45
200	89,72

4.1.1.5 Limite de Quantificação referente ao método de análise da rifampicina em plasma de ratos por CLAE.

Tabela 3 - Precisão e exatidão do limite de quantificação da rifampicina

Concentração plasmática ($\mu\text{g/mL}$)	Valor obtido ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV, %)	Exatidão (%de erro)
--	--------------------------------------	---------------------	------------------------

0,5	0,414	9,47	17,2
-----	-------	------	------

CV = coeficiente de variação; n = 6

Figura 10. Coeficiente de correlação linear da curva de calibração do método de análise de rifampicina em plasma, com a inclusão da concentração no limite de quantificação de $0,5\mu\text{g/mL}$

4.1.1.6 Especificidade do método de análise da rifampicina em plasma de ratos por CLAE.

Tabela 4 - Especificidade do método de análise da rifampicina

Fármaco	concentração (µg/mL)	t _R (min)
Cefalexina	1,0	9,45
Paracetamol	20,0	6,26
Diazepam	2,5	6,25
Diclofenaco	1,0	3,23
Dapsona	1,0	ND
Dexametazona	1,0	4,93
Enalapril	2,0	4,91
Clofazimina	0,5	ND
Monoacetildapsona	0,1	ND
Pindolol	1,0	3,64
Fenacetina	0,01	6,28
Rifampicina	50	6,44
Sulindaco	50	4,46
Minociclina	1,0	ND
Amiodarona	5,0	3,63
Teofilina	5,0	8,82
Ofloxacina	1,0	ND

t_R= tempo de retenção, ND=não detectado em um tempo de 30 minutos

4.1.1.7 Estabilidade do método de análise da rifampicina em plasma de ratos por CLAE.

Realizamos a verificação da estabilidade dos fármacos rifampicina e sulindaco (padrão interno), como descrito no item 3.2.2.7 e evidenciamos que a estabilidade para as soluções foi de 4 meses, porém, com adição de ácido ascórbico na matriz biológica.

4.1.2 Análise simultânea da ofloxacina e minociclina em plasma de ratos por CLAE

4.1.2.1 Cromatogramas referentes à metodologia analítica de análise da ofloxacina e da minociclina em amostras de plasma de ratos.

Figura 11. Cromatogramas referentes à análise cromatográfica da ofloxacina e minociclina
A) Plasma Branco; B) Plasma adicionado com os padrões de ofloxacina e minociclina (5µg/mL)(tR=tempo de retenção em minutos. tR=4,69 min para minociclina e tR=9,142 min para ofloxacina); C) Plasma de rato tratado com 40mg/Kg de ofloxacina e minociclina (tR=tempo de retenção em minutos. tR=4,41 min para minociclina e tR=8,983 min para ofloxacina)

4.1.2.2 Curva de calibração e curva de Linearidade referente ao método de análise simultâneo da ofloxacina e minociclina em plasma de ratos por CLAE.

Figura 12. Curva de calibração (A) e linearidade de 0,5 a 40 μ g/mL para minociclina e de 0,5 a 80 μ g/mL para ofloxacina (B) referente ao do método simultâneo de análise da ofloxacina e minociclina em plasma de ratos

4.1.2.3 Precisão e Exatidão referente ao método de análise simultâneo da ofloxacina e minociclina em plasma de ratos por CLAE.

Tabela 5 - Precisão e exatidão do método desenvolvido para análise rifampicina em plasma de ratos

Concentração real	Concentração obtida (µg/mL)	Precisão (CV, %)	Exatidão (% de erro)
Intra-ensaio (n = 10)			
<i>Minociclina</i>			
2µg/mL plasma	1,75	8,32	12,5
5µg/mL plasma	5,096	13,87	1,92
10µg/mL plasma	10,17	6,4	1,7
<i>Ofloxacina</i>			
2µg/mL plasma	1,70	5,08	15
5µg/mL plasma	4,22	13,5	15,6
10µg/mL plasma	10,10	3,6	1,0
Inter-ensaio (n=5)			
<i>Minociclina</i>			
2µg/mL plasma	1,78	13,6	11
5µg/mL plasma	4,75	15,4	5
10µg/mL plasma	9,52	13,6	4,8
<i>Ofloxacina</i>			
2µg/mL plasma	1,70	10	15
5µg/mL plasma	4,34	12,6	13,2
10µg/mL plasma	8,67	9	13,3

CV = coeficiente de variação.

4.1.2.4 Recuperação referente ao método de análise simultâneo da ofloxacina e minociclina em plasma de ratos por CLAE.

Tabela 6 - Resultados obtidos na avaliação da recuperação do método desenvolvido

Concentração plasmática ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação Absoluta (%)
Minociclina	
0,5	82,84
2	86,44
5	91,73
10	90,47
Ofloxacina	
0,5	101,38
2	95,93
5	89,50
10	84,18

4.1.2.5 Limite de Quantificação referente ao método de análise simultâneo da ofloxacina e minociclina em plasma de ratos por CLAE.

Tabela 7 – Valores de precisão e exatidão do limite de quantificação da ofloxacina e da minociclina

Concentração plasmática ($\mu\text{g/mL}$)	Valor obtido ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV,%)	Exatidão (%de erro)
Minociclina			
0,125	0,138	15,83	10,4
Ofloxacina			
0,125	0,117	14,37	6,11

CV = coeficiente de variação; n = 6

Figura 13. Coeficiente de determinação linear da curva de calibração do método simultâneo de análise da ofloxacina e minociclina em plasma, com a inclusão da concentração no limite de quantificação de 0,125µg/mL

4.1.2.6 Especificidade do método de análise simultâneo da ofloxacina e minociclina em plasma de ratos por CLAE.

Tabela 8 - Avaliação da especificidade do método simultâneo de análise da ofloxacina e minociclina

Fármaco	concentração (µg/mL)	t _R (min)
Ciprofloxacina	100	5,27
Norfloxacina	100	4,65
Isoniazida	50	ND
Rifampicina	50	ND
Dapsona	10	13,87
Sulindaco	50	ND
Metildopa	25	ND
Clofazimina	0,5	ND
Claritromicina	50	ND
Fenilbutazona	2,5	ND

Continua

continuação

Tabela 8 - Avaliação da especificidade do método simultâneo de análise da ofloxacina e minociclina.

Fenacetina	0,01	ND
Minociclina	5,0	4,69
Ofloxacina	5,0	9,14

4.1.2.7 *Estabilidade do método de análise simultâneo da ofloxacina e minociclina em plasma de ratos por CLAE.*

Realizou-se a verificação da estabilidade dos fármacos ofloxacina e minociclina , como descrito no item 3.2.2.7, evidenciando que a estabilidade destas soluções foi de 4 meses, acondicionadas em tubo âmbar.

4.2 *Análise da relação dose administrada versus concentração plasmática, realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em esquema de DOSE ÚNICA.*

A tabela 9 e figura 14 ilustram a comparação das três concentrações da rifampicina isolada e associada com ofloxacina e minociclina, evidenciando um aumento significativo na concentração plasmática da rifampicina isolada nas doses de 100 e 200mg/kg, comparadas com a dose de 50mg/kg. Comparando-se as doses de 100 e 200mg/kg, não se observou diferença. Comparando-se o fármaco isolado com o associado a ofloxacina e minociclina, observou-se aumento significativo da concentração plasmática na associação nos esquemas ROM II e ROM III, comparando-os com a RFP100 e RFP200 isolada.

Tabela 9 – Concentrações plasmáticas em µg/mL da rifampicina 50mg/kg, 100mg/kg e 200mg/kg, administradas em esquema de dose única isoladas(RFP50, RFP100, RFP200) e associadas com ofloxacina e minociclina (ROM I, ROM II e ROM III)

Animal	RFP 50	ROM I	RFP 100	ROM II	RFP 200	ROM III
1	32,89	32,92	80,50	150,64	85,11	112,75
2	32,65	28,47	84,80	104,56	95,14	111,79
3	31,50	29,90	92,26	127,28	87,66	124,73
4	32,15	37,57	87,26	122,39	88,79	132,49
5	31,02	40,95	90,15	132,74	80,29	140,90
6	30,43	36,30	83,48	128,60	96,30	105,36
7	35,9	33,5	83	143,20	102,40	105,60
8	29,25	40,88	86,88	122,37	110,70	122,47
Média ± sd	31,9 ± 1,98	35,0 ± 4,68	86,0 ± 3,88	128,9 ± 13,9#	93,29 ± 9,9	119,5 ± 12,8§

= p < 0,05 em relação a RFP100; § = p < 0,05 em relação a RFP200; sd= desvio padrão

Figura 14. Comparação das concentrações plasmáticas da rifampicina administrada na dose de 50, 100 e 200mg/kg (RFP50, RFP100, RFP200) isolada, com rifampicina 50, 100 e 200mg/kg associada com ofloxacina 40, 80 e 160mg/kg e minociclina 10, 20 e 40mg/kg(ROM I, II e III)

* p<0,05 em comparação com RFP100 e RFP200

A tabela 10 e figura 15 ilustram a comparação das três concentrações da ofloxacina isolada e associada com rifampicina e minociclina, mostrando aumento significativo da concentração plasmática do fármaco isolado, e associado à rifampicina e minociclina.

A tabela 11 e figura 16 ilustram a comparação das três concentrações da minociclina isolada e associada com rifampicina e ofloxacina, evidenciando um aumento significativo na concentração plasmática quando administrada isolada. Comparando-se o fármaco isolado com os grupos que receberam a minociclina associada a rifampicina e ofloxacina, ocorreu o inverso observado com os dois outros fármacos (rifampicina e ofloxacina), ou seja, nas doses de 20 e 40mg/kg ocorreu uma redução significativa nos níveis plasmáticos, enquanto que na menor dose, não houve diferença considerável.

Tabela 10 – Concentrações plasmáticas em µg/mL da ofloxacina 40mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg, administradas em esquema de dose única isoladas (OFLX40, OFLX80, OFLX160) e associadas com rifampicina e minociclina (ROM I, ROM II e ROM III)

Animal	OFLX 40	ROM I	OFLX 80	ROM II	OFLX 160	ROM III
1	2,05	6,57	6,05	10,71	10,63	30,48
2	1,58	7,61	4,08	17,76	11,90	26,63
3	1,57	7,56	3,61	16,94	11,42	25,99
4	1,40	6,53	2,64	14,57	8,46	23,82
5	1,18	5,83	3,89	13,12	7,21	40,05
6	1,29	6,30	4,90	10,42	9,39	42,48
7	1,78	5,97	5,23	16,14	10,40	48,77
8	1,87	7,15	5,07	15,70	9,67	31,09
Média ± sd	1,59 ± 0,29	6,69 ± 0,68*	4,43 ± 1,08	14,42 ± 2,76#	9,88 ± 1,54	33,66 ± 9,01§

= p < 0,05 em relação a OFLX40; # = p < 0,05 em relação a OFLX80; § = p < 0,05 em relação a OFLX160
sd = desvio padrão

Figura 15. Comparação das concentrações plasmáticas da ofloxacina, administrada na dose de 40, 80 e 160mg/kg (OFLX40, OFLX80, OFLX160) isolada, com rifampicina 40, 80 e 160mg/kg associada com rifampicina 50, 100 e 200mg/kg e minociclina 10, 20 e 40mg/kg (ROM I, II e III)

* p < 0,05 em comparação com OFLX40, OFLX80 e OFLX160

Tabela 11 – Concentrações plasmáticas em µg/mL da minociclina 10mg/kg, 20mg/kg e 40mg/kg, administradas em esquema de dose única isoladas(MINO10, MINO20, MINO40) e associadas com rifampicina e ofloxacina (ROM I, ROM II e ROM III)

Animal	MINO 10	ROM I	MINO 20	ROM II	MINO 40	ROM III
1	2,39	4,28	7,56	5,49	13,45	7,75
2	2,76	3,38	6,18	5,23	13,46	6,60
3	2,48	3,64	5,12	2,60	10,80	7,00
4	2,94	3,50	6,30	2,38	12,95	9,36
5	2,85	3,15	6,45	2,74	10,68	5,89
6	3,64	3,88	5,66	2,92	11,38	6,14
7	2,67	2,75	7,11	1,75	12,50	4,73
8	3,85	2,46	6,86	2,08	11,43	3,53
Média ± sd	2,94 ± 0,52	3,38 ± 0,59	6,40 ± 0,78	3,14 ± 1,41#	12,08 ± 1,14	6,37 ± 1,78§

= p < 0,05 em relação a MINO20; § = p < 0,05 em relação a MINO40; sd = desvio padrão

Figura 16. Comparação das concentrações plasmáticas da minociclina administrada na doses de 10, 20 e 40mg/kg (MINO10, MINO20, MINO40) isolada, com minociclina 10, 20 e 40mg/kg associada com rifampicina 50, 100 e 200mg/kg e ofloxacina 40, 80 e 160mg/kg (ROM I, II e III)

* p<0,05 em comparação com MINO20 e MINO40

4.3 Análise da relação dose administrada versus concentração plasmática, realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em esquema de DOSES MÚLTIPLAS.

A tabela 12 e figura 17 ilustram a comparação da rifampicina 100, ofloxacina 80 e minociclina 20mg/kg administradas isoladamente e associadas (ROM II), evidenciando uma redução significativa na concentração plasmática da rifampicina quando administrada associada. Com a ofloxacina e a minociclina, não observou-se significância entre os valores obtidos, quando comparados com o esquema associado ROM.

Tabela 12 – Concentrações plasmáticas em µg/mL da rifampicina 100mg/kg, ofloxacina 40mg/kg e minociclina 20mg/kg administradas em esquema de doses múltiplas (RFP100, OFLX40 e MINO20) e associadas

Animal	RFP 100	ROM II	OFLX 80	ROM II	MINO 20	ROM II
1	138,20	42,04	1,71	6,53	5,86	7,05
2	69,58	59,56	5,22	6,20	8,10	8,96
3	90,70	35,04	3,62	4,06	9,00	8,29
4	86,07	19,18	3,72	4,12	4,23	5,20
5	83,98	36,29	2,32	4,52	6,20	8,13
6	107,55	41,88	2,04	7,70	7,87	6,25
7	105,61	46,87	1,58	3,10	6,61	5,64
8	73,52	47,53	2,10	5,63	8,63	7,82
Média ± sd	97,38 ±22,22	41,04 ± 1,6*	2,78 ± 1,27	5,23 ± 1,53#	7,06 ± 1,61	7,16 ± 1,35

* = $p < 0,05$ em relação a RFP100 ; # = $p < 0,05$ em relação a OFLX40; sd = desvio padrão

Figura 17. Comparação das concentrações plasmáticas da rifampicina 100, ofloxacina 80 e da minociclina 20mg/kg administradas isoladamente, com os mesmos fármacos associados (ROM II)

* $p < 0,05$ em comparação com RFP100

4.4 Análise dos parâmetros Bioquímicos, Hematológicos e Hemostáticos em esquema de DOSE UNICA

São apresentados os valores obtidos para cada parâmetro em estudo, na forma de figuras que incluem marcação nos grupos com diferenças estatisticamente significativas, comparando-se o grupo controle com os respectivos grupos tratados (# - comparação com controle) e comparando-se os tratamentos dos fármacos isolados nas três doses, com os mesmos associados (* - comparação com ROM). Comparamos, os valores dos grupos controles com os três fármacos (rifampicina nas doses de 50, 100 e 200mg/kg (RFP50, RFP100 e RFP200); ofloxacina 40, 80 e 160mg/kg (OFLX40, OFLX80 e OFLX160); minociclina 10, 20 e 40mg/kg (MINO10, MINO20 e MINO40)), administrados isolados e associados (RFP50+OFLX40+MINO10 – ROM I; RFP100+OFLX80+MINO20 – ROM II e RFP200+OFLX160+MINO40 – ROM III), em regime de dose única.

Nas faixas onde a média se aproxima da mediana, é provável que os valores tenham uma dispersão mais simétrica dos valores ao redor da média. As comparações foram realizadas com base nas médias e medianas, permitindo uma caracterização da distribuição dos valores dentro de cada faixa (intervalo de valores obtidos para cada parâmetro, representado no gráfico na forma de uma barra vertical (*high-low closed bar/ blox plot*). Desta forma, nas faixas onde há uma diferença maior entre média e mediana, entende-se que a amplitude da faixa foi alterada por um ou por poucos animais, enquanto que nas faixas onde a média coincide com a mediana, é provável que os valores tiveram uma dispersão mais simétrica dos valores ao redor da média.

A figura 18 apresenta os resultados obtidos para o parâmetro Alanina-aminotransferase (ALT). Pode-se observar na figura 18-A um aumento na RFP50 com relação ao grupo controle e ao ROM II, e uma redução comparando-se OFLX40 comparando-se com o grupo controle e com ROM II. Na figura 18-B observa-se o mesmo perfil da anterior com relação a RFP50, seguido por um aumento da OFLX40 comparada ao ROM II, e uma redução da MINO 10 comparada ao ROM II. A figura 18-C demonstra o mesmo comportamento para a RFP50, para a OFLX40 e para a MINO10, porém com uma redução da mesma comparada também com o grupo controle.

A figura 19 demonstra valores obtidos para o parâmetro Aspartato-aminotransferase (AST). Na figura 19-A observa-se um aumento no grupo RFP50 comparado com o controle, uma redução com OFLX40 comparado com o controle e com ROM II, e uma redução também comparando MINO10 com ROM II. O mesmo foi observado no gráfico 19-B, porém com redução da OFLX80, comparada só com o grupo controle e um aumento no grupo ROM III, em relação ao controle. O mesmo perfil foi seguido na figura 19-C.

Resultados obtidos para o parâmetro Alanina-aminotransferase (ALT)

Figura 18. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

Resultados obtidos para o parâmetro Aspartato-aminotransferase (AST)

Figura 19. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

A figura 20 representa os resultados obtidos para o parâmetro Fosfatase Alcalina (ALP). Podemos observar na figura 20-A e 20-B uma redução do grupo OFLX40 comparado ao grupo ROM I, e uma redução do grupo RFP100, comparado com o grupo controle, respectivamente. Na figura 20-C, não observamos diferenças estatisticamente significativas.

A figura 21 representa os resultados obtidos para o parâmetro Gama-glutamilttransferase (GGT). Observamos uma redução em todos os grupos tratados comparados com o grupo controle (figuras 21-A, B e C), mas um aumento isolado do grupo RFP100 comparado com o grupo ROM II (Figura 21-B).

Resultados obtidos para o parâmetro Fosfatase Alcalina (ALP)

Resultados obtidos para o parâmetro Gama-glutamilttransferase (GGT)

Figura 21. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

A figura 22 representa os resultados obtidos para o parâmetro Proteínas Totais séricas (PT). Pode-se observar na figura 22-A uma redução nos níveis séricos no grupo RFP50 e MINO10, em relação ao grupo controle e ao grupo ROM I, e um aumento no grupo OFLX40 em relação ao grupo ROM I. Na figura 22-B, observa-se o mesmo perfil para os grupos RFP100 e MINO20, onde no grupo OFLX40 se manteve inalterada, e na figura 22-C, uma redução nos grupos RFP200 e OFLX160 em relação ao grupo controle e ao grupo ROM III, e um aumento no grupo MINO40 comparado com o grupo controle e com ROM III, e um aumento deste em relação com grupo controle.

A figura 23 representa os resultados obtidos para o parâmetro Albumina sérica. Na figura 23-A, uma redução nos valores foi observada nos grupos RFP50 comparado ao grupo controle e ao grupo ROM I, um aumento no grupo OFLX40 em relação ao grupo controle, uma redução do grupo MINO10 comparado ao grupo ROM I, e um aumento deste em comparação com o grupo controle. A figura 23-B ilustra exatamente o mesmo perfil, e a figura 23-C, o mesmo perfil para o grupo RFP200, tendo o grupo OFLX160 se mantendo sem diferenças significativas, e o grupo MINO40 sofrendo uma elevação comparado com o grupo controle e com ROM III, e este agora, apresentando uma redução quando comparado com o grupo controle.

Resultados obtidos para o parâmetro Proteínas totais (PT)

Figura 22. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

Resultados obtidos para o parâmetro Albumina

Figura 23. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

A figura 24 representa os resultados obtidos para o parâmetro Bilirrubinas Totais séricas (BT). A figura 24-A demonstra aumento estatisticamente significativo para RFP50 comparado ao grupo controle, e uma redução comparado ao grupo ROMI, uma redução do grupo OFLX40 em relação ao grupo ROM I, e um aumento do grupo MINO10 comparado ao grupo controle mas redução deste mesmo, quando comparado com o grupo ROM I, e este apresentando um aumento significativo comparado com o grupo controle. Na figura 24-B o grupo RFP100 demonstrou um aumento comparado ao grupo controle, assim como OFLX80 e MINO20 também, demonstrando ambos uma redução quando comparados com o grupo ROM II, e este apresentando um aumento em comparação com o grupo controle. A figura 24-C demonstra o mesmo perfil da anterior, porém com redução do grupo OFLX160 e MINO40, comparado somente ao grupo ROM III.

A figura 25 representa os resultados obtidos para o parâmetro Bilirrubina Direta sérica (BD). Ocorreu aumento no grupo RFP50 comparado com o grupo controle e uma redução quando comparado ao grupo ROM I, redução do grupo OFLX40 comparado com o grupo controle e com ROM I e redução do grupo MINO10 comparado ao grupo ROM I, e aumento deste quando comparado com o grupo controle (figura 25-A). A figura 25-B ilustra o mesmo perfil, porém, com o grupo RFP100 apresentando aumento somente quando comparado com o grupo controle. O mesmo perfil da figura 25-B, foi observado na figura 25-C, com exceção do grupo MINO40 que apresentou redução também quando comparada ao grupo controle.

Resultados obtidos para o parâmetro Bilirrubina Total (BT)

Figura 24. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; **B)** Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; **C)** Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

Resultados obtidos para o parâmetro Bilirrubina Direta (BD)

Figura 25. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

A figura 26 representa os resultados obtidos para o parâmetro Uréia sérica. A figura 26-A ilustra uma redução nos valores séricos apenas no grupo OFLX40 quando comparado ao grupo ROM I. Na figura 26-B demonstra um aumento nos grupos RFP100, OFLX80 e MINO20 quando comparados com o grupo controle, e um aumento também no grupo RFP100 comparado com o grupo ROM II.. Um aumento no grupo RFP200, OFLX160, MINO40 e ROM III foi observado comparando-os com o grupo controle, e uma redução nos grupos OFLX160 e MINO 40, comparando-os com ROM III (Figura 26-C).

A figura 27 representa os resultados obtidos para o parâmetro Creatinina sérica. Observamos na figura 27-A um aumento nos níveis séricos do grupo RFP50 comparado ao grupo controle e ao grupo ROM I, uma redução no grupo OFLX40 comparado ao grupo ROM I e um aumento no grupo MINO10 comparado ao controle. A figura 27-B demonstra o mesmo perfil, porém com o grupo MINO20 sofrendo uma redução tanto em relação ao grupo controle quanto com ROM II, e este demonstrando um aumento comparado ao grupo controle. Os grupos RFP200 e MINO40 demonstraram um aumento em relação aos grupos controle e ROM III (Figura 27-C).

Resultados obtidos para o parâmetro Uréia

Figura 26. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

Figura 27. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

A figura 28 representa os resultados obtidos para o parâmetro Amilase sérica. A figura 28-A demonstra uma redução nos níveis séricos nos grupos OFLX40 e MINO10, comparados com o grupo controle e com o grupo ROM I. Na figura 28-B observamos um aumento nos grupos OFLX80 e ROM II, quando comparados com o grupo controle, e uma redução nos grupos RFP100 e MINO20, quando comparados com o grupo ROM II. A figura 28-C demonstra o mesmo perfil do anterior, com exceção do grupo MINO40 que demonstrou uma elevação comparado com o grupo controle.

Resultados obtidos para o parâmetro Amilase

Figura 28. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacin 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacin 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacin 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

A figura 29 representa os resultados obtidos para o parâmetro Hematócrito (Ht). Uma redução nos valores foi observada nos grupos RFP50 e MINO10 quando comparados com o grupo ROM I, e um aumento quando comparado com o grupo controle (Figura 29-A). A figura 29-B ilustra o mesmo perfil da anterior, porém com o grupo RFP100 sofrendo uma redução quando comparado ao grupo ROM II. O grupo RFP200 na figura 29-C demonstra além de uma redução comparada ao grupo ROM III, um aumento comparado com o grupo controle, mantendo-se o mesmo perfil observado na figura 29-B.

A figura 30 representa os resultados obtidos para o parâmetro Eritrócitos. Observa-se na figura 30-A um aumento dos valores para o grupo RFP50 comparado com os grupos controle e ROM I, e uma redução comparando-se o grupo MINO10 com o grupo ROM I. Um aumento também foi observado no grupo RFP100 e ROM II comparando-os com o grupo controle, e uma redução no grupo OFLX80, comparando-o com o grupo ROM II (Figura 30-B). A figura 30-C demonstra o mesmo perfil da anterior, com uma redução significativa no grupo MINO40 comparado com o grupo controle.

Figura 29. **A)** Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; **B)** Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; **C)** Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

Resultados obtidos para o parâmetro Eritrócitos

Figura 30. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

A figura 31 representa os resultados obtidos para o parâmetro Hemoglobina (Hb). Observamos uma redução no grupo RFP50 e MINO10 comparado com o grupo ROM I, e um aumento deste comparado com o grupo controle (figura 31-A), um aumento no grupo RFP100 e ROM II comparados com o grupo controle e uma redução dos grupos OFLX80 e MINO20, quando comparados com o grupo ROM II (Figura 31-B) e exatamente o mesmo perfil foi observado na figura 31-C.

A figura 32 representa os resultados obtidos para o parâmetro Volume Corpuscular Médio (VCM). Observamos uma redução estatisticamente significativa comparando o grupo RFP50 com os grupos controle e ROM I e uma redução no grupo OFLX40 comparado com o grupo ROM I, e um aumento deste, quando comparado com o grupo controle (Figura 32-A). Na figura 32-B, o grupo RFP100 demonstra uma redução comparado aos grupos controle e ROM II, o grupo OFLX80 evidencia um aumento comparado com o grupo controle, e o grupo MINO 20 ilustra uma redução comparado com o grupo ROM II. O mesmo perfil é seguido na figura 32-C, porém sem diferenças no grupo da MINO40.

Resultados obtidos para o parâmetro Hemoglobina (Hb)

Resultados obtidos para o parâmetro Volume Corpuscular Médio (VCM)

Figura 32. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com grupo controle e com ROM III

A figura 33 representa os resultados obtidos para o parâmetro Hemoglobina Corpuscular Média (HCM). As figuras 33-A e 33-B evidenciam uma redução no grupo RFP100, quando comparado ao grupo controle e ao grupo ROM I e ROM II, respectivamente. A figura 33-C evidencia o mesmo perfil das anteriores, porém com uma elevação do grupo OFLX160 comparado com o grupo controle.

A figura 34 representa os resultados obtidos para o parâmetro Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Os grupos OFLX40 e MINO10 demonstram na figura 34-A uma elevação quando comparados com o grupo controle e com o grupo ROM I, o que apresenta uma redução quando comparado com o grupo controle. Na figura 34-B, os grupos OFLX80 e MINO20 evidenciam um aumento comparando-os com ROM II, que sofreu uma redução em relação ao grupo controle. Apenas uma redução no grupo OFLX160 em comparação com o grupo ROM III foi observada na figura 34-C.

Resultados obtidos para o parâmetro Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

Figura 33. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

Resultados obtidos para o parâmetro Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

Figura 34. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacin 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacin 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacin 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

A figura 35 representa os resultados obtidos para o parâmetro Leucócitos. Observamos na figura 35-A um aumento do grupo RFP50 em relação ao grupo ROM I, e um aumento do grupo OFLX40 em relação aos grupos controle e ROM I. Não foi evidenciado diferenças entre os grupos comparados (Figura 35-B). Nos grupos RFP200 e MINO40 evidenciou-se um aumento significativo quando comparados com o grupo ROM III, que apresenta-se reduzido comparado ao grupo controle (Figura 35-C).

A figura 36 representa os resultados obtidos para o parâmetro Linfócitos. Observa-se na figura 36-A uma redução nos grupos RFP50 e ROM I, quando comparados com o grupo controle e um aumento do grupo OFLX40 em relação aos grupos controle e ROM I, e aumento do grupo MINO10 comparado ao grupo ROM I, que apresenta-se reduzido em relação ao grupo controle. Na figura 36-B, somente o grupo ROM II demonstrou redução quando comparado ao grupo controle. O mesmo perfil foi observado na figura 36-C, porém com um aumento do grupo MINO40 em relação ao grupo ROM III, que demonstra-se reduzido quando comparado ao grupo controle.

Resultados obtidos para o parâmetro Leucócitos

Resultados obtidos para o parâmetro Linfócitos

Figura 36. **A)** Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; **B)** Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; **C)** Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

A figura 37 representa os resultados obtidos para o parâmetro Eosinófilos. Podemos observar diferença estatisticamente significativa no grupo OFLX80, que demonstra uma redução em relação aos grupos controle e ROM II.

A figura 38 representa os resultados obtidos para o parâmetro Monócitos. A figura 38-A demonstra um aumento nos grupos RFP50, OFLX40 e MINO10 quando comparados com o grupo ROM I, que demonstra uma redução quando comparado ao grupo controle, acontecendo o mesmo com o grupo RFP50. Nos grupos RFP100 e MINO20 evidencia-se um aumento quando comparados com o grupo ROM II, que juntamente com o grupo OFLX80 demonstram uma redução, comparados com o grupo controle (Figura 38-B). Na figura 38-C observa-se um aumento no grupo RFP200, comparado com o grupo ROM III, e este juntamente com o grupo OFLX160, demonstram uma redução, comparados ao grupo controle.

Resultados obtidos para o parâmetro Eosinófilos

Figura 37. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

Resultados obtidos para o parâmetro Monócitos

Figura 38. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP50), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

A figura 39 representa os resultados obtidos para o parâmetro neutrófilos bastonetes. Em virtude de se ter uma distribuição diferenciada entre os valores obtidos, realizamos uma análise estatística diferenciada para este parâmetro em virtude do número excessivo de valores 0, o que nos obrigou a realizar um teste estatístico não-paramétrico. Pode-se observar, comparando-se as medianas que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas nas figuras 39-A, 39-B e 39-C, ressaltando a importância de uma análise estatística direcionada para cada caso em questão.

A figura 40 representa os resultados obtidos para o parâmetro neutrófilos segmentados. Observa-se um aumento nos grupos RFP50, OFLX40 e ROM I quando comparados com o grupo controle, e um aumento do grupo RFP50 em relação ao grupo ROM I (Figura 40-A). Nos grupos RFP100, OFLX80, MINO20 e ROM II, evidencia-se um aumento comparando-os com o grupo controle, e uma redução no grupo OFLX80, comparado com o grupo ROM II (Figura 40-B). Observou-se um aumento nos grupos RFP200 e MINO40, comparando-os com os grupos controle e ROM III, que apresenta-se aumentado em relação ao grupo controle (Figura 40-C).

Resultados obtidos para o parâmetro Bastonetes

Figura 39. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

Resultados obtidos para o parâmetro Segmentados

Figura 40. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

A figura 41 representa os resultados obtidos para o parâmetro Tempo de Protrombina (TP). As figuras 41-A e B demonstram um aumento nos grupos RFP50, MINO10 e RFP100 e MINO20, quando comparados com os grupos controle, ROM I e ROM II, respectivamente. O mesmo observou-se na figura 41-C, porém com o grupo OFLX160 demonstrando redução comparado ao grupo ROM III, que apresenta-se aumentado em relação ao grupo controle.

A figura 42 representa os resultados obtidos para o parâmetro Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA). Observa-se uma redução do grupo RFP50 em relação aos grupos controle e ROM I, que apresenta-se com valor superior ao grupo controle (Figura 42-A). O grupo RFP100 demonstra redução comparado ao grupo ROM II, e o grupo OFLX80 apresenta um aumento comparado com os grupos controle e ROM II (Figura 42-B). A figura 42-C evidencia um aumento nos grupos OFLX160 e MINO40 quando comparados com o grupo ROM III.

Resultados obtidos para o parâmetro Tempo de Protrombina (TP)

Figura 41. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

Resultados obtidos para o parâmetro Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA)

Figura 42. A) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 50 (RFP50), ofloxacina 40 (OFLX40) e minociclina 10mg/kg (MINO10), comparados com o grupo controle e com ROM I; B) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20mg/kg (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II; C) Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 200 (RFP200), ofloxacina 160 (OFLX160) e minociclina 40 (MINO40), comparados com o grupo controle e com ROM III

4.5 Análise dos parâmetros Bioquímicos, Hematológicos e Hemostáticos em esquema de DOSES MÚLTIPLAS

A figura 43 apresenta os resultados obtidos para o parâmetro Alanina-aminotransferase (ALT), onde podemos observar uma redução nos valores dos grupos RFP100 e MINO20 em relação aos grupos controle e ROM II e um aumento no grupo OFLX80 em relação ao grupo ROM II, que apresenta-se elevado em comparação com o grupo controle.

A figura 44 demonstra valores obtidos para o parâmetro Aspartato-aminotransferase (AST), onde observa-se um aumento somente no grupo RFP100, em relação aos grupos controle ROM II.

Resultados obtidos para o parâmetro Alanina-aminotransferase (ALT)

Figura 43. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Aspartato-aminotransferase (AST)

Figura 44. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

A figura 45 apresenta os resultados obtidos para o parâmetro Fosfatase Alcalina (ALP), onde observa-se uma redução nos valores dos grupos RFP100 e MINO20 em relação aos grupos controle e ROM II e um aumento no grupo OFLX80 em relação ao grupo ROM II, que apresenta-se reduzido em relação ao grupo controle.

A figura 46 demonstra valores obtidos para o parâmetro Gama-glutamilttransferase (GGT), onde observa-se uma redução nos valores dos grupos RFP100, OFLX80 e MINO20, comparados com o grupo controle e com o grupo ROM II, que demonstra também uma redução comparado ao grupo controle.

Resultados obtidos para o parâmetro Fosfatase Alcalina (ALP)

Figura 45. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Gama - glutamiltransferase (GGT)

Figura 46. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

A figura 47 apresenta os resultados obtidos para o parâmetro Proteínas totais (PT), onde observa-se uma redução nos valores dos grupos RFP100, OFLX80 e MINO20 em relação aos grupos controle ROM II, que se apresenta elevado em comparação com o grupo controle.

A figura 48 ilustra valores obtidos para o parâmetro Albumina, evidenciando uma redução nos valores dos grupos RFP100 e MINO20, comparados com os grupos controle e ROM II, e um aumento no grupo OFLX80 em relação ao grupo ROM II, que apresenta-se com valor superior ao grupo controle.

Resultados obtidos para o parâmetro Proteínas totais (PT)

Figura 47. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Albumina

Figura 48. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

A figura 49 apresenta os resultados obtidos para o parâmetro Bilirrubina total (BT), ilustrando um aumento nos valores do grupo RFP100 comparado com os grupos controle e ROM II, uma redução para o grupo OFLX80 em relação ao grupo ROM II e uma redução do grupo MINO20 em relação aos grupos controle e ROM II, que apresenta-se aumentado, comparado ao grupo controle.

A figura 50 ilustra valores obtidos para o parâmetro Bilirrubina direta (BD), evidenciando um aumento no grupo RFP100 em comparação com os grupos controle e ROM II, um aumento do grupo OFLX80 em comparação com o grupo controle e uma redução em comparação com o grupo ROM II, e ainda uma redução no grupo MINO20 comparada ao grupo ROM II, que demonstra uma elevação comparando-se com o grupo controle.

Resultados obtidos para o parâmetro Bilirrubina Total (BT)

Figura 49. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Bilirrubina Direta (BD)

Figura 50. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

A figura 51 apresenta os resultados obtidos para o parâmetro Uréia, evidenciando uma redução apenas nos valores do grupo RFP100 comparado com os grupos controle e ROM II.

A figura 52 ilustra valores obtidos para o parâmetro Creatinina, onde observa-se uma redução dos valores do grupo OFLX80 em comparação com o grupo ROM II, e uma redução no grupo MINO20 comparado aos grupos controle e ROM II, que demonstra uma elevação comparado ao grupo controle.

Resultados obtidos para o parâmetro Uréia

Figura 51. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Creatinina

Figura 52. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

A figura 53 ilustra valores obtidos para o parâmetro Amilase, onde observa-se uma redução dos valores do grupo RFP100 em comparação com os grupos controle e ROM II, e um aumento do grupo OFLX80 e redução no grupo MINO20 comparado ao grupo controle e ao grupo ROM II, que demonstra uma elevação comparado ao grupo controle.

Figura 53. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

As figuras 54 e 55 ilustram os valores obtidos para os parâmetros hematócrito e eritrócitos, onde não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa.

A figura 56 ilustra os valores obtidos para o parâmetro hemoglobina. Observamos um aumento nos valores somente no grupo RFP100 em relação aos grupos controle e ROM II.

A figura 57 demonstra os valores obtidos para o parâmetro VCM, onde não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa nos grupos tratados.

A figura 58 ilustra os valores obtidos para o parâmetro Hemoglobina Corpuscular Média, onde observa-se um aumento nos valores somente no grupo RFP100 comparado com o grupo controle, e uma redução comparado com o grupo ROM II.

A figura 59 demonstra os valores obtidos para o parâmetro Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, evidenciando um aumento nos valores somente do grupo MINO20, em relação aos grupos controle e ROM II.

Figura 54. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Figura 55. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Figura 56. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Volume Corpuscular Médio (VCM)

Figura 57. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

Figura 58. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

Figura 59. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

A figura 60 demonstra os valores obtidos para o parâmetro Leucócitos, onde observa-se um aumento nos valores nos grupos RFP100 e OFLX80 em relação ao grupo ROM II, uma redução do grupo MINO20 em relação ao grupo controle, e uma redução do grupo ROM II em relação ao grupo controle.

A figura 61 ilustra os valores obtidos para o parâmetro Linfócitos, onde se observa uma redução nos valores obtidos dos grupos RFP100, MINO20 e ROM II em relação ao grupo controle, e um aumento do grupo OFLX80, em relação ao grupo ROM II.

A figura 62 demonstra os valores obtidos para o parâmetro Eosinófilos. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A figura 63 ilustra os valores obtidos para o parâmetro Monócitos, onde observa-se um aumento nos grupos OFLX80 e MINO20 em relação ao grupo ROM II, e neste uma redução em relação ao grupo controle.

A figura 64 mostra valores obtidos para o parâmetro neutrófilos bastonetes. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

A figura 65 evidencia valores obtidos para o parâmetro neutrófilos segmentados, onde observa-se um aumento no grupo RFP100, em relação aos grupos controle e ROM II.

Resultados obtidos para o parâmetro Leucócitos

Figura 60. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Linfócitos

Figura 61. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Eosinófilos

Figura 62. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Monócitos

Figura 63. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Bastonetes

Figura 64. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Segmentados

Figura 65. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

A figura 66 representa os valores obtidos para o parâmetro Tempo de Protrombina, onde observa-se um aumento no grupo RFP100 comparado com o grupo controle, uma redução do grupo OFLX80 em relação ao grupo ROM II, um aumento do grupo MINO20 em relação ao grupo controle, e uma redução deste em relação ao grupo ROM II, que demonstra um aumento comparado ao grupo controle.

A figura 67 demonstra os valores obtidos para o parâmetro Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado, e evidencia uma redução no grupo RFP100 em relação ao grupo ROM II, uma redução do grupo OFLX80 em relação aos grupos controle e ROM II, um aumento do grupo MINO20, em relação ao grupo controle, e uma redução deste em relação ao grupo ROM II, que apresenta-se aumentado em relação ao grupo controle.

Resultados obtidos para o parâmetro Tempo de Protrombina (TP)

Figura 66. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

Resultados obtidos para o parâmetro Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA)

Figura 67. Resultados obtidos para animais tratados com rifampicina 100 (RFP100), ofloxacina 80 (OFLX80) e minociclina 20 (MINO20), comparados com o grupo controle e com ROM II

4.6 Resultados Morfológicos

4.6.1 Histopatologia

a) Grupo controle

O fígado é composto de hepatócitos, células hematopoiéticas, colangiócitos (células dos ductos biliares), células que formam os sinusóides, células de Kupffer, células armazenadoras de gordura (células de Ito) e as células *pit* (em fossa).

Os hepatócitos estão arrançados em lâmina ou cordões verticais à veia centrolobular em canalículos biliares entre hepatócitos adjacentes no cordão. Os cordões têm a espessura de uma célula e formam anastomoses. Os sinusóides são formados por uma camada contínua de células endoteliais fenestradas e estão presentes entre os cordões de hepatócitos, enquanto o espaço perisinusoidal (espaço de Disse) localiza-se entre o hepatócito e a parede dos sinusóides (Figuras 68 e 69).

Os hepatócitos são células poliédricas, com núcleo arredondado de tamanho variável. O núcleo apresenta um ou mais nucléolos proeminentes. O citoplasma é eosinofílico e granular, dependendo do estado funcional, gordura ou glicogênio pode dar-lhe um aspecto vacuolar. Embora 80% dos hepatócitos sejam morfolologicamente homogêneos (Figuras 68 e 69).

As células de Kupffer são macrófagos fixos e constituem cerca de 10% das células do fígado do rato. Estas células estão situadas nas células endoteliais sinusoidais e cerca de 40% das células de Kupffer estão nas áreas periportais (Figura 69).

As células de Ito ou células armazenadoras de gordura, células perisinusoidais, lipócito ou célula estrelada, apresentam gotas de lipídios citoplasmáticos em número variável.

O espaço porta contém vasos e ductos biliares em estroma de tecido conjuntivo limitando os lóbulos hepáticos.

O aspecto histológico do fígado de ratos do grupo H₂O (animais que receberam H₂O) está apresentado nas figuras 68 e 69. Estes grupos nos serviram para uma comparação com o grupo controle utilizado no estudo (DMSO), que por si só já induziram algumas alterações.

As figuras 70 e 71 representam o aspecto histológico do fígado de ratos que receberam DMSO, que foram comparados com os grupos tratados posteriormente. Todas as comparações foram feitas entre o grupo controle DMSO e os grupos tratados com os fármacos componentes do esquema ROM.

Figura 68. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo controle (H₂O)

Figura 69. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo controle (H₂O)

Figura 70. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo controle (DMSO)

Figura 71. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo controle (DMSO)

b) Grupos RFP50, RFP100 e RFP200 mg/kg – Dose única

As três dosagens provocaram ao fígado alterações semelhantes. Os hepatócitos mostraram-se, em algumas áreas, com aspecto semelhante ao do animal controle (DMSO). Entretanto, no geral, estas células eram mais volumosas, com citoplasma mais abundante, mais granulosas e com numerosos vacúolos. No animal tratado com a dosagem de 100mg/kg, observou-se áreas de necrose liquefativa. O número de células/mm³ estava diminuído. Os núcleos eram de menor volume, sem alteração de forma. Os vasos estavam dilatados e congestos e o espaço-porta desorganizado.

Figura 72. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo RFP50mg/kg

Figura 73. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo RFP100mg/kg

Figura 74. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo RFP200mg/kg

b) Grupos OFLX40, OFLX80 e OFLX160 mg/kg – Dose única

Na dosagem de 40mg/kg, os animais mostraram hepatócitos mais granulosos com poucos vacúolos, muito semelhantes aos do grupo controle, cujos núcleos eram menos volumosos sem alterações de forma. Observou-se algumas áreas de necrose liquefativa.

Nas dosagens de 80 e 160mg/kg, os hepatócitos eram mais volumosos, repletos de vacúolos grandes, com núcleos menos volumosos. O número de células/mm³ estava reduzido. Os vasos estavam dilatados e congestos. Observou-se ninhos de inflamação crônica e áreas de necrose liquefativa.

Figura 75. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo OFLX40mg/kg

Figura 76. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo OFLX80mg/kg

Figura 77. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo OFLX160mg/kg

c) Grupos MINO10, MINO20 e MINO40 mg/kg – Dose única

Os ratos tratados com a dosagem de 10mg/kg apresentaram estrutura hepática semelhante à do grupo controle. Os hepatócitos eram mais granulosos com poucos vacúolos. Os núcleos eram menos volumosos e mais alongados.

Nas dosagens de 20 e 40mg/kg, os hepatócitos eram volumosos, mais granulosos e com poucos vacúolos; seus núcleos eram menos volumosos sem alteração de forma. O número de células/mm³ estava reduzido. Foram observados vasos dilatados e congestos, espaço-porta desorganizado e áreas de necrose liquefativa.

Figura 78. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo MINO10mg/kg

Figura 79. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo MINO20mg/kg

Figura 80. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo MINO40mg/kg

c) Grupos ROM I (RFP50 + OFLX40 + MINO10), ROM II (RFP100 + OFLX80 + MINO20) e ROM III (RFP200 + OFLX160 + MINO40) – Dose única

No fígado dos ratos que receberam as três doses, os hepatócitos eram mais volumosos, com citoplasma granuloso e vacuolado, núcleos menores sem alteração de forma e em menor número por mm³. Os vasos estavam dilatados e congestionados e o espaço-porta desorganizado. Foram observados focos de inflamação crônica no grupo ROM III e áreas de destruição tecidual no grupo ROM I (necrose liquefativa).

Figura 81. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo ROM I

Figura 82. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo ROM II

Figura 83. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo ROM III**b) Grupos RFP100, OFLX80, MINO20 mg/kg e ROM II - Doses múltiplas***b.1) RFP 100*

Observa-se algumas áreas semelhantes às do grupo controle. Outras mostraram hepatócitos maiores, granuloso e vacuolado, com núcleos menores. O número de células/mm³ estava reduzido. Em um animal observou-se uma área de hemorragia circundada por células inflamatórias crônicas com alguns neutrófilos.

b.2) OFLX 80

Observou-se hepatócitos mais volumosos e grandemente vacuolados, com núcleos menores. Os vasos estão aumentados e congestionados e com áreas de liquefação.

b.3) MINO 20

Neste grupo evidenciou-se hepatócitos mais volumosos e vacuolados, com núcleos menores. O número de células/mm³ estava reduzido. Observou-se vasos dilatados e congestionados e focos de inflamação crônica.

b.4) ROM II

Evidenciou-se hepatócitos vacuolados e mais volumosos, com núcleos menores sem alteração de forma. O número de células/mm³ estava reduzido. Os vasos estavam dilatados e congestionados e foram observados focos de inflamação crônica.

Figura 84. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo RFP100

Figura 85. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo OFLX80

Figura 86. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo MINO20

Figura 87. Aspecto histológico do fígado de rato do grupo ROM II

4.7 Resultados Morfométricos

4.7.1 Cariometria dos hepatócitos – esquema dose única

A tabela 13 ilustra os valores médios do grupo controle e dos grupos que receberam a rifampicina nas concentrações de 50, 100 e 200mg/kg. Da análise estatística evidenciou-se diferenças significantes entre todos os grupos confrontados com o grupo controle. Observou-se assim, redução do diâmetro maior, menor e médio, sem diferenças na relação entre diâmetro maior/menor. Em relação aos parâmetros volume, área, perímetro e relação volume/área, em todos os grupos observa-se redução, em comparação com o grupo controle. Não se evidenciou diferenças estatisticamente significativas na excentricidade, no coeficiente de forma e no índice de contorno.

Na tabela 14, observou-se diferenças entre os ratos tratados com ofloxacina, nas três doses administradas, e os animais do grupo controle. Evidenciou-se uma redução no diâmetro maior, menor e médio, assim como na relação diâmetro maior/menor na dose intermediária (80mg/kg). Nos parâmetros volume, área, perímetro e relação volume/área, também mostraram-se com redução significativa. Da mesma forma, a excentricidade, coeficiente de forma e o índice de contorno não mostraram diferenças estatisticamente significativas.

Analisando-se a tabela 15, observou-se diferenças estatisticamente significativas nos grupos que receberam a minociclina nas três concentrações (10, 20 e 40mg/kg), quando comparados ao grupo controle. Observou-se redução nos valores para diâmetro maior, menor e médio, e relação diâmetro maior/menor na menor dose de minociclina (10mg/kg). Os valores para volume, área, perímetro, relação volume/área e excentricidade, coeficiente de forma (menor dose 10mg/kg) eram menores quando comparados aos do grupo controle.

A tabela 16 mostra os valores médios para a associação dos três fármacos, nas três doses utilizadas, classificando os grupos como ROM I, II e III, que foram comparados com o grupo controle. Evidenciou-se uma redução significativa no diâmetro maior, menor e médio, assim como no volume, área, perímetro e relação volume/área. O teste estatístico não mostrou significância nos confrontos realizados para os parâmetros excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno.

Na tabela 17 comparou-se os grupos tratados com os fármacos isolados em relação ao grupo que recebeu os mesmos fármacos nas mesmas concentrações (menor dose), porém associados. Observou-se, valores significativamente aumentados para o grupo ROM I nos parâmetros: diâmetro maior em relação ao grupo RFP50 e MINO10, diâmetro menor em relação a RFP50 e OFLX40, diâmetro médio em relação a RFP50 e OFLX40, relação D/d em relação a MINO10, volume, área e perímetro em relação a RFP50, relação V/A em relação a RFP50 e OFLX40, excentricidade e coeficiente de forma em relação a MINO10. Os demais parâmetros não evidenciaram diferenças estatisticamente significantes.

A tabela 18 mostra os valores dos grupos que receberam os fármacos isolados, comparados com aquele que recebeu os fármacos associados na dose intermediária. Pode-se observar nos valores aumentos no grupo ROM II nos seguintes parâmetros: diâmetro maior, menor e médio em relação a RFP100, relação D/d em relação a RFP100 e OFLX80, volume, área, perímetro e relação V/A em relação a RFP100 e excentricidade em relação a OFLX80. Os demais parâmetros não evidenciaram diferenças estatisticamente significantes.

Na tabela 19 estão contidos os valores dos grupos que receberam os fármacos isolados na dose máxima administrada, comparados com os do grupo que recebeu os mesmos fármacos associados. Observou-se um aumento significativo no grupo ROM III nos parâmetros: diâmetro menor e médio em relação a RFP200, volume, área, perímetro e relação V/A em relação a RFP200. Os demais parâmetros não evidenciaram diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 13 – Cariometria dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo controle (C) e RFP50, 100 e 200mg/kg (RFP50, RFP100 e RFP200). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	C	RFP 50	RFP 100	RFP 200
Diâmetro maior	9,57	7,11	7,33	7,72
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Diâmetro menor	8,61	6,18	6,60	6,98
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Diâmetro médio	9,07	6,29	6,95	7,33
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Relação D/d	1,114	1,10	1,11	1,11
U=		12,5 ^{ns}	7,0 ^{ns}	11,0 ^{ns}
P / U / =		0,91	0,29	0,83
Volume	397,91	163,13	181,32	210,18
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Área	65,03	36,20	38,37	42,50
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Perímetro	28,61	21,15	21,92	23,12
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Relação V/A	6,05	4,36	4,63	4,89
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Excentricidade	0,34	0,34	0,33	0,34
U=		8,00 ^{ns}	9,5 ^{ns}	10,0 ^{ns}
P / U / =		0,40	0,60	0,69
Coefficiente de forma	0,99	0,99	0,99	0,99
U=		12,50 ^{ns}	12,50 ^{ns}	10,0 ^{ns}
P / U / =		0,90	0,90	0,65
Índice de Contorno	3,56	3,55	3,55	3,55
U=		6,5 ^{ns}	10,5 ^{ns}	10,5 ^{ns}
P / U / =		0,24	0,74	0,74

^{ns} não-significante

Tabela 14 – Cariometria dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo controle (C) e OFLX40, 80 e 160mg/kg (OFLX40, OFLX80 e OFLX160). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	C	OFLX 40	OFLX 80	OFLX 160
Diâmetro maior	9,57	7,70	7,88	7,76
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Diâmetro menor	8,61	6,95	7,30	7,18
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Diâmetro médio	9,07	7,31	7,58	7,46
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Relação D/d	1,114	1,11	1,084	1,086
U=		12,50 ^{ns}	1,00	3,00 ^{ns}
P / U / =		0,91	0,021	0,058
Volume	397,91	208,64	231,42	221,94
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Área	65,03	42,24	45,35	44,02
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Perímetro	28,61	23,04	23,86	23,49
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Relação V/A	6,05	4,87	5,05	4,97
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Excentricidade	0,34	0,33	0,27	0,27
U=		11,50 ^{ns}	3,0 ^{ns}	3,5 ^{ns}
P / U / =		0,916	0,059	0,075
Coefficiente de forma	0,99	0,99	0,99	0,99
U=		10,0 ^{ns}	10,0 ^{ns}	5,0 ^{ns}
P / U / =		0,65	0,64	0,13
Índice de Contorno	3,56	3,55	3,55	3,55
U=		8,5 ^{ns}	8,4 ^{ns}	8,5 ^{ns}
P / U / =		0,45	0,45	0,45

^{ns} não-significante

Tabela 15 – Cariometria dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo controle (C) e MINO10, 20 e 40mg/kg (MINO10, MINO20 e MINO40). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	C	MINO 10	MINO 20	MINO 40
Diâmetro maior	9,57	7,43	7,84	8,11
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Diâmetro menor	8,61	6,88	7,12	7,45
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Diâmetro médio	9,07	7,14	7,47	7,77
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Relação D/d	1,114	1,08	1,10	1,09
U=		2,5	12,0 ^{ns}	3,5 ^{ns}
P / U / =		0,04	0,99	0,07
Volume	397,91	195,97	222,82	249,80
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Área	65,03	40,44	44,12	47,68
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Perímetro	28,61	22,49	23,53	24,46
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Relação V/A	6,05	4,76	4,97	5,18
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Excentricidade	0,34	0,26	0,32	0,29
U=		2,0	12,0 ^{ns}	7,0 ^{ns}
P / U / =		0,03	0,99	0,30
Coefficiente de forma	0,99	0,998	0,990	0,996
U=		2,5	12,5 ^{ns}	5,0 ^{ns}
P / U / =		0,04	0,90	0,13
Índice de Contorno	3,56	3,55	3,558	3,55
U=		10,0 ^{ns}	10,5 ^{ns}	10,0 ^{ns}
P / U / =		0,65	0,74	0,65

^{ns} não-significante

Tabela 16 – Cariometria dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo controle (C) e ROM I (RFP50+OFLX40+MINO10), ROM II (RFP100+OFLX80+MINO20) e ROM III (RFP200+OFLX160+MINO40). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	C	ROM I	ROM II	ROM III
Diâmetro maior	9,57	7,86	7,98	7,92
U=		0	0	0
P / U =		0,007	0,007	0,007
Diâmetro menor	8,61	7,09	7,28	7,29
U=		0	0	0
P / U =		0,007	0,007	0,007
Diâmetro médio	9,07	7,46	7,62	7,60
U=		0	0	0
P / U =		0,007	0,007	0,007
Relação D/d	1,114	1,112	1,10	1,09
U=		9,5 ^{ns}	10,0 ^{ns}	5,0 ^{ns}
P / U =		0,59	0,67	0,13
Volume	397,91	222,01	234,20	233,81
U=		0	0	0
P / U =		0,007	0,007	0,007
Área	65,03	44,03	45,77	45,61
U=		0	0	0
P / U =		0,007	0,007	0,007
Perímetro	28,61	23,52	24,00	23,92
U=		0	0	0
P / U =		0,007	0,007	0,007
Relação V/A	6,05	4,97	5,07	5,06
U=		0	0	0
P / U =		0,007	0,007	0,007
Excentricidade	0,34	0,33	0,31	0,30
U=		9,5 ^{ns}	10,5 ^{ns}	8,0 ^{ns}
P / U =		0,60	0,75	0,42
Coefficiente de forma	0,99	0,99	0,992	1,0
U=		12,5 ^{ns}	10,0 ^{ns}	9,5 ^{ns}
P / U =		0,90	0,65	0,53
Índice de Contorno	3,56	3,56	3,55	3,55
U=		12,5 ^{ns}	6,5 ^{ns}	6,0 ^{ns}
P / U =		0,90	0,24	0,22

^{ns} não-significante

Tabela 17 – Cariometria dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo ROM I (fármacos associados) e dos grupos que receberam os fármacos isolados (RFP50, OFLX40 e MINO 10mg/kg). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	ROM I	RFP 50	OFLX 40	MINO 10
Diâmetro maior	7,86	7,11	7,70	7,43
$U=$		0	4,0 ^{ns}	1,0
$P / U =$		0,007	0,007	0,01
Diâmetro menor	7,09	6,18	6,95	6,88
$U=$		0	2,5	5,0 ^{ns}
$P / U =$		0,007	0,04	0,15
Diâmetro médio	7,46	6,29	7,31	7,14
$U=$		0	2,0	3,0 ^{ns}
$P / U =$		0,007	0,03	0,055
Relação D/d	1,112	1,10	1,11	1,08
$U=$		10,0 ^{ns}	11,50 ^{ns}	1,0
$P / U =$		0,67	0,91	0,02
Volume	222,01	163,13	208,64	195,97
$U=$		0	5,0 ^{ns}	3,0 ^{ns}
$P / U =$		0,007	0,15	0,055
Área	44,03	36,20	42,24	40,44
$U=$		0	4,0 ^{ns}	3,0 ^{ns}
$P / U =$		0,007	0,09	0,055
Perímetro	23,52	21,15	23,04	22,49
$U=$		0	3,5 ^{ns}	3,0 ^{ns}
$P / U =$		0,007	0,07	0,055
Relação V/A	4,97	4,36	4,87	4,76
$U=$		0	2,5	3,0 ^{ns}
$P / U =$		0,007	0,04	0,055
Excentricidade	0,33	0,34	0,33	0,26
$U=$		12,0 ^{ns}	12,50 ^{ns}	0
$P / U =$		0,99	0,916	0,007
Coefficiente de forma	0,99	0,99	0,99	0,998
$U=$		12,50 ^{ns}	10,0 ^{ns}	2,5
$P / U =$		0,90	0,65	0,04
Índice de Contorno	3,56	3,55	3,55	3,55
$U=$		6,5 ^{ns}	8,5 ^{ns}	10,0 ^{ns}
$P / U =$		0,24	0,45	0,65

^{ns} não-significante

Tabela 18 – Cariometria dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo ROM II (fármacos associados) e dos grupos que receberam os fármacos isolados (RFP 100, OFLX 80 e MINO 20mg/kg). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	ROM II	RFP 100	OFLX 80	MINO 20
Diâmetro maior	7,98	7,33	7,88	7,84
U=		0	4,5 ^{ns}	5,0 ^{ns}
P / U / =		0,007	0,11	0,15
Diâmetro menor	7,28	6,60	7,30	7,12
U=		0	11,5 ^{ns}	5,0 ^{ns}
P / U / =		0,007	0,91	0,15
Diâmetro médio	7,62	6,95	7,58	7,47
U=		0	8,0 ^{ns}	5,0 ^{ns}
P / U / =		0,007	0,42	0,15
Relação D/d	1,10	1,11	1,084	1,10
U=		2,5	1,00	8,5 ^{ns}
P / U / =		0,04	0,021	0,45
Volume	234,20	181,32	231,42	222,82
U=		0	9,0 ^{ns}	5,0 ^{ns}
P / U / =		0,007	0,54	0,15
Área	45,77	38,37	45,35	44,12
U=		0	8,0 ^{ns}	5,0 ^{ns}
P / U / =		0,007	0,42	0,15
Perímetro	24,00	21,92	23,86	23,53
U=		0	8,0 ^{ns}	5,0 ^{ns}
P / U / =		0,007	0,42	0,15
Relação V/A	5,07	4,63	5,05	4,97
U=		0	9,0 ^{ns}	5,0 ^{ns}
P / U / =		0,007	0,52	0,15
Excentricidade	0,31	0,33	0,27	0,32
U=		7,0 ^{ns}	1,0	10,0 ^{ns}
P / U / =		0,29	0,02	0,67
Coefficiente de forma	0,992	0,99	0,99	0,990
U=		10,0 ^{ns}	10,0 ^{ns}	10,0 ^{ns}
P / U / =		0,65	0,64	0,65
Índice de Contorno	3,55	3,55	3,55	3,558
U=		7,5 ^{ns}	8,4 ^{ns}	7,5 ^{ns}
P / U / =		0,33	0,45	0,33

^{ns} não-significante

Tabela 19 – Cariometria dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo ROM III (fármacos associados) e dos grupos que receberam os fármacos isolados (RFP 200, OFLX 160 e MINO 40mg/kg). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	ROM III	RFP 200	OFLX 160	MINO 40
Diâmetro maior	7,92	7,72	7,76	8,11
U=		5,0 ^{ns}	5,0 ^{ns}	6,5 ^{ns}
P / U / =		0,14	0,14	0,24
Diâmetro menor	7,29	6,98	7,18	7,45
U=		1,5	6,5 ^{ns}	6,0 ^{ns}
P / U / =		0,02	0,24	0,20
Diâmetro médio	7,60	7,33	7,46	7,77
U=		2,0	5,0 ^{ns}	6,0 ^{ns}
P / U / =		0,03	0,14	0,22
Relação D/d	1,09	1,11	1,086	1,09
U=		4,0 ^{ns}	8,5 ^{ns}	10,5 ^{ns}
P / U / =		0,09	0,45	0,74
Volume	233,81	210,18	221,94	249,80
U=		2,0	6,0 ^{ns}	6,0 ^{ns}
P / U / =		0,03	0,22	0,22
Área	45,61	42,50	44,02	47,68
U=		2,0	6,0 ^{ns}	6,0 ^{ns}
P / U / =		0,03	0,22	0,22
Perímetro	23,92	23,12	23,49	24,46
U=		2,0	4,5 ^{ns}	6,0 ^{ns}
P / U / =		0,03	0,11	0,22
Relação V/A	5,06	4,89	4,97	5,18
U=		2,0	5,0 ^{ns}	6,0 ^{ns}
P / U / =		0,02	0,14	0,22
Excentricidade	0,30	0,34	0,27	0,29
U=		4,0 ^{ns}	7,0 ^{ns}	12,5 ^{ns}
P / U / =		0,09	0,29	0,91
Coefficiente de forma	1,0	0,99	0,99	0,996
U=		10,0 ^{ns}	5,0 ^{ns}	5,0 ^{ns}
P / U / =		0,65	0,13	0,13
Índice de Contorno	3,55	3,55	3,55	3,55
U=		10,5 ^{ns}	8,5 ^{ns}	10,0 ^{ns}
P / U / =		0,74	0,45	0,65

^{ns} não-significante

4.7.2 Cariometria dos hepatócitos – esquema doses múltiplas

A tabela 20 ilustra os valores dos grupos que receberam os fármacos na dose intermediária isolados e associados, comparando-os com o grupo controle.

Observou-se uma redução estatisticamente significativa nos tratamentos em comparação com o grupo controle, em todos os parâmetros cariométricos, exceto para excentricidade no grupo RFP100, e nos parâmetros coeficiente de forma e índice de contorno, que não evidenciaram diferenças entre os grupos comparados.

A tabela 21 ilustra os mesmos valores, excetuando-se o grupo controle, já que o objetivo agora, é estabelecer uma comparação entre os fármacos associados (ROM II) e os grupos que receberam os fármacos isolados. O grupo ROM II evidenciou um valor aumentado em relação aos demais em todos os parâmetros, exceto para a relação D/d em relação a MINO20, excentricidade em relação a MINO20 e coeficiente de forma e índice de contorno, que não demonstraram significância estatística para todos os grupos comparados.

Tabela 20 – Cariometria dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo controle (C) e RFP100, OFLX80, MINO20 e ROM II (RFP100+OFLX80+MINO20). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	C	RFP 100	OFLX 80	MINO 20	ROM II
Diâmetro maior	9,57	8,13	7,96	8,29	8,60
U=		0	0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007	0,007
Diâmetro menor	8,61	7,50	7,42	7,74	8,11
U=		0	0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007	0,007
Diâmetro médio	9,07	7,80	7,68	8,00	8,34
U=		0	0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007	0,007
Relação D/d	1,114	1,088	1,076	1,074	1,062
U=		4,5 ^{ns}	0	0	0
P / U / =		0,11	0,007	0,007	0,007
Volume	397,91	253,21	238,87	275,31	311,33
U=		0	0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007	0,007
Área	65,03	48,11	46,60	50,75	55,15
U=		0	0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007	0,007
Perímetro	28,61	24,57	24,19	25,19	26,27
U=		0	0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007	0,007
Relação V/A	6,05	5,21	5,12	5,33	5,21
U=		0	0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007	0,007
Excentricidade	0,34	0,286	0,248	0,252	0,222
U=		5,5 ^{ns}	0	1,0	0
P / U / =		0,17	0,007	0,02	0,007
Coefficiente de forma	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00
U=		5,0 ^{ns}	9,5 ^{ns}	9,5 ^{ns}	9,5 ^{ns}
P / U / =		0,13	0,53	0,53	0,53
Índice de Contorno	3,56	3,55	3,55	3,55	3,55
U=		6,5 ^{ns}	6,5 ^{ns}	6,5 ^{ns}	6,5 ^{ns}
P / U / =		0,24	0,24	0,24	0,24

^{ns} não-significante

Tabela 21 – Cariometria dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo ROM II (associados) e dos grupos isolados (RFP100, OFLX80, MINO20 mg/kg). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	ROM II	RFP 100	OFLX 80	MINO 20
Diâmetro maior	8,60	8,13	7,96	8,29
U=		0	0	1,0
P / U / =		0,007	0,007	0,01
Diâmetro menor	8,11	7,50	7,42	7,74
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Diâmetro médio	8,34	7,80	7,68	8,00
U=		0	0	1,0
P / U / =		0,007	0,007	0,01
Relação D/d	1,062	1,088	1,076	1,074
U=		0,5	1,0	3,5 ^{ns}
P / U / =		0,01	0,02	0,07
Volume	311,33	253,21	238,87	275,31
U=		0	0	1,0
P / U / =		0,007	0,007	0,01
Área	55,15	48,11	46,60	50,75
U=		0	0	1,0
P / U / =		0,007	0,007	0,01
Perímetro	26,27	24,57	24,19	25,19
U=		0	0	1,0
P / U / =		0,007	0,007	0,01
Relação V/A	5,21	5,21	5,12	5,33
U=		0	0	1,0
P / U / =		0,007	0,007	0,01
Excentricidade	0,222	0,286	0,248	0,252
U=		1,5	2,0	3,0 ^{ns}
P / U / =		0,02	0,03	0,059
Coefficiente de forma	1,00	0,99	1,00	1,00
U=		5,0 ^{ns}	9,5 ^{ns}	9,5 ^{ns}
P / U / =		0,13	0,53	0,53
Índice de Contorno	3,55	3,55	3,55	3,55
U=		6,5 ^{ns}	6,5 ^{ns}	6,5 ^{ns}
P / U / =		0,24	0,24	0,24

^{ns} não-significante

4.8 Resultados Estereológicos

4.8.1 Estereologia dos hepatócitos – esquema dose única

A tabela 22 mostra os valores médios dos parâmetros estereológicos em relação à ripampicina, nas três doses administradas e os do grupo controle, onde observou-se um aumento significativo no volume citoplasmático e volume celular e uma redução nos parâmetros relação N/C e densidade numérica, em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle.

De acordo com dados constantes da tabela 23, observou-se situação semelhante à descrita anteriormente, quando da utilização de ofloxacina, que foi administrada nas três doses propostas e confrontadas com o grupo controle. Observou-se então um aumento nos volumes citoplasmático e celular, com uma redução na relação N/C e na densidade numérica.

A tabela 24 mostra os valores para os grupos que receberam a minociclina nas três doses, que foram confrontados com o grupo controle. Observou-se um aumento nos volumes citoplasmático e celular apenas nas doses de 20 e 40mg/kg, além de uma redução na relação N/C e redução na densidade numérica, nestes grupos de animais.

Nos esquemas associados (ROM), observou-se resultados bem semelhantes aos grupos RFP e OFLX, sendo constatado um aumento nos volumes citoplasmático e celular, e redução na relação N/C e densidade numérica nos três grupos tratados (Tabela 25).

Tabela 22 – Estereologia dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo controle (C) e RFP50, 100 e 200mg/kg (RFP50, RFP100 e RFP200). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	C	RFP 50	RFP 100	RFP 200
Volume citoplasmático	3817,9	5162,8	5369,1	5627,8
U=		2,0	1,0	0
P / U / =		0,03	0,01	0,007
Volume celular	4215,8	5430,3	5550,4	5837,8
U=		0	2,0	2,0
P / U / =		0,007	0,03	0,03
Relação N / C	0,1050	0,026	0,033	0,037
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Densidade numérica	245425	172134	182287	173451
U=		0	2,0	2,0
P / U / =		0,007	0,03	0,03

Tabela 23 – Estereologia dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo controle (C) e OFLX40, 80 e 160mg/kg (OFLX40, OFLX80 e OFLX160). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	C	OFLX 40	OFLX 80	OFLX 160
Volume citoplasmático	3817,9	5168,9	5927,5	6071,9
U=		1,0	0	0
P / U / =		0,01	0,007	0,007
Volume celular	4215,8	5377,5	6158,9	6293,8
U=		3,0 ^{ns}	0	0
P / U / =		0,055	0,007	0,007
Relação N / C	0,1050	0,040	0,038	0,036
U=		0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007
Densidade numérica	245425	189345	163907	159763
U=		3,0 ^{ns}	0	0
P / U / =		0,055	0,007	0,007

^{ns} não-significante

Tabela 24 – Estereologia dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo controle (C) e MINO10, 20 e 40mg/kg (MINO10, MINO20 e MINO40). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	C	MINO 10	MINO 20	MINO 40
Volume citoplasmático	3817,9	4801	6156,8	6322,9
$U=$		5,0 ^{ns}	0	0
$P / U =$		0,15	0,007	0,007
Volume celular	4215,8	4997	6379,6	6573,3
$U=$		6,0 ^{ns}	0	0
$P / U =$		0,22	0,007	0,007
Relação N / C	0,1050	0,040	0,035	0,039
$U=$		0	0	0
$P / U =$		0,007	0,007	0,007
Densidade numérica	245425	204888	160352	152424
$U=$		6,0 ^{ns}	0	0
$P / U =$		0,22	0,007	0,007

^{ns} não-significante

Tabela 25 – Estereologia dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo controle (C) e ROM I (RFP50+OFLX40+MINO10), ROM II (RFP100+OFLX80+MINO20) e ROM III (RFP200+OFLX160+MINO40). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	C	ROM I	ROM II	ROM III
Volume citoplasmático	3817,9	6427,7	6505,7	6176,6
$U=$		0	0	0
$P / U =$		0,007	0,007	0,007
Volume celular	4215,8	6649,7	6739,9	6410,4
$U=$		0	0	0
$P / U =$		0,007	0,007	0,007
Relação N / C	0,1050	0,0388	0,0358	0,0372
$U=$		0	0	0
$P / U =$		0,007	0,007	0,007
Densidade numérica	245425	150588	148967	156431
$U=$		0	0	0
$P / U =$		0,007	0,007	0,007

A tabela 26 mostra os valores estereológicos médios dos grupos que receberam os fármacos na dose mínima (RFP50, OFLX40, MINO 10mg/kg) isolados e na forma associada. Observou-se valores aumentados nos grupos que receberam a associação nos parâmetros volume citoplasmático e volume celular e um aumento significativo na relação N/C em relação ao grupo RFP50 e uma redução no parâmetro densidade numérica em relação ao grupo OFLX40 e MINO10.

Para os grupos que receberam as doses intermediárias, a análise estatística demonstrou diferenças significantes, apontando um aumento no grupo ROM II em relação ao grupo RFP100 para os parâmetros volume citoplasmático e volume celular. A relação N/C não mostrou diferenças estatísticas e observou-se uma redução na densidade numérica, em relação ao grupo RFP100 (Tabela 27).

A tabela 28 mostra os valores dos grupos que receberam os fármacos nas doses superiores. Não se observou qualquer diferença significativa entre os grupos analisados.

Tabela 26 – Estereologia dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo ROM I (fármacos associados) e dos grupos que receberam os fármacos isolados (RFP 50, OFLX 40 e MINO 10mg/kg). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	ROM I	RFP 50	OFLX 40	MINO 10
Volume citoplasmático	6427,7	5162,8	5168,9	4801
U=		0	2,0	0
P / U / =		0,007	0,03	0,007
Volume celular	6649,7	5430,3	5377,5	4997
U=		0	1,0	0
P / U / =		0,007	0,01	0,007
Relação N / C	0,0388	0,026	0,040	0,040
U=		0	4,0 ^{ns}	4,0 ^{ns}
P / U / =		0,007	0,09	0,09
Densidade numérica	150588	172134	189345	204888
U=		4,0 ^{ns}	1,0	0
P / U / =		0,09	0,01	0,007

^{ns} não-significante

Tabela 27 – Estereologia dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo ROM II (fármacos associados) e dos grupos que receberam os fármacos isolados (RFP 100, OFLX 80 e MINO 20mg/kg). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	ROM II	RFP 100	OFLX 80	MINO 20
Volume citoplasmático	6505,7	5369,1	5927,5	6156,8
U=		0	6,0 ^{ns}	9,0 ^{ns}
P / U / =		0,007	0,22	0,54
Volume celular	6739,9	5550,4	6158,9	6379,6
U=		0	6,0 ^{ns}	9,0 ^{ns}
P / U / =		0,007	0,22	0,54
Relação N / C	0,0358	0,033	0,038	0,035
U=		7,0 ^{ns}	8,0 ^{ns}	11,0 ^{ns}
P / U / =		0,30	0,42	0,84
Densidade numérica	148967	182287	163907	160352
U=		0	6,0 ^{ns}	9,0 ^{ns}
P / U / =		0,007	0,22	0,54

^{ns} não-significante

Tabela 28 – Estereologia dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo ROM III (fármacos associados) e dos grupos que receberam os fármacos isolados (RFP 200, OFLX 160 e MINO 40mg/kg). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	ROM III	RFP 200	OFLX 160	MINO 40
Volume citoplasmático	6176,6	5627,8	6071,9	6322,9
$U=$		7,0 ^{ns}	11,0 ^{ns}	9,0 ^{ns}
$P / U / =$		0,30	0,84	0,54
Volume celular	6410,4	5837,8	6293,8	6573,3
$U=$		7,0 ^{ns}	11,0 ^{ns}	9,0 ^{ns}
$P / U / =$		0,30	0,84	0,54
Relação N / C	0,0372	0,037	0,036	0,039
$U=$		5,0 ^{ns}	9,5 ^{ns}	10,0 ^{ns}
$P / U / =$		0,15	0,60	0,69
Densidade numé rica	156431	173451	159763	152424
$U=$		7,0 ^{ns}	11,0 ^{ns}	9,0 ^{ns}
$P / U / =$		0,30	0,84	0,54

^{ns} não-significante

4.8.2 Estereologia dos hepatócitos – esquema doses múltiplas

A tabela 29 mostra os valores médios dos grupos que receberam os fármacos, quando comparados com o grupo controle. Evidenciou-se diferenças estatisticamente significantes em todos os parâmetros analisados. Observou-se um aumento nos valores do volume citoplasmático e volume celular em todos os grupos tratados comparados ao do grupo controle. Uma redução na relação N/C e na densidade numérica também foi observada em todos os grupos.

Entre o grupo ROM II e os fármacos isolados, não se observou qualquer diferença significativa (Tabela 30).

Tabela 29 – Estereologia dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo controle (C) e RFP100, OFLX80, MINO20 e ROM II (RFP100+OFLX80+MINO20). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	C	RFP 100	OFLX 80	MINO 20	ROM II
Volume citoplasmático	3817,9	6093,9	6098,1	5817,2	6435
U=		0	0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007	0,007
Volume celular	4215,8	6347,2	6333,1	6092,5	6746,3
U=		0	0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007	0,007
Relação N / C	0,1050	0,0331	0,0388	0,0359	0,0358
U=		0	0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007	0,007
Densidade numérica	245425	158068	161813	165827	150087
U=		0	0	0	0
P / U / =		0,007	0,007	0,007	0,007

Tabela 30 – Estereologia dos núcleos dos hepatócitos de ratos machos do grupo ROM II (fármacos associados) e dos grupos que receberam os fármacos isolados (RFP 100, OFLX 80 e MINO 20mg/kg). Teste de Mann-Whitney

Parâmetros	ROM II	RFP 100	OFLX 80	MINO 20
Volume Citoplasmático	6435	6093,9	6098,1	5817,2
U=		10,0 ^{ns}	9,0 ^{ns}	8,0 ^{ns}
P / U / =		0,69	0,54	0,42
Volume celular	6746,3	6347,2	6333,1	6092,5
U=		9,0 ^{ns}	9,0 ^{ns}	8,0 ^{ns}
P / U / =		0,54	0,54	0,42
Relação N / C	0,0358	0,0331	0,0388	0,0359
U=		7,0 ^{ns}	8,0 ^{ns}	11,0 ^{ns}
P / U / =		0,30	0,42	0,84
Densidade numérica	150087	158068	161813	165827
U=		9,0 ^{ns}	9,0 ^{ns}	8,0 ^{ns}
P / U / =		0,54	0,54	0,42

^{ns} não-significante

5 DISCUSSÃO

A hanseníase, doença infecciosa crônica causada pelo patógeno intracelular *Mycobacterium leprae*, é endêmica no Brasil, onde o número de casos registrados da doença posiciona o país como o segundo lugar do mundo, sendo um dos poucos da América Latina a registrar crescimento das taxas de detecção de casos (BRASIL, 1999; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

Além dos casos registrados e em tratamento, é estimado que, durante o período de 2000-2005, cerca de 2,5 milhões de pessoas serão acometidas de hanseníase e necessitarão ser diagnosticadas e tratadas (WHO, 2000).

O tratamento preconizado pela OMS utiliza o esquema de poliquimioterapia composto pela rifampicina, clofazimina e dapsona, para os casos multibacilares. Para os pacientes portadores da forma paucibacilar, tem-se uma proposta de administração da associação entre rifampicina, ofloxacina e minociclina (esquema ROM) em dose única, ou ainda o mesmo tratamento administrado a pacientes impossibilitados de utilizar a clofazimina, portadores da forma multibacilar, onde se realizam estudos complementares para assegurar a eficácia terapêutica com o mínimo de reação adversa (BRASIL, 1999; KATOCH, 2002; BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

Como a literatura não traz estudos mais conclusivos a respeito do esquema ROM até o momento, exige-se uma avaliação mais criteriosa e minuciosa sobre o esquema proposto, visto que, as interações medicamentosas observáveis entre os esquemas vigentes relaciona os efeitos adversos principalmente ao uso da rifampicina, destacando-se hepatotoxicidade e mais raramente anemia hemolítica (GOULART et al., 2002).

No presente estudo realizou-se a validação de metodologias analíticas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para quantificação dos três fármacos que compõem o esquema ROM, e averiguamos possíveis efeitos adversos dos fármacos administrados isolados e associados, através de investigação de parâmetros bioquímicos, hematológicos, hemostáticos e histopatológicos.

- Validação da metodologia por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e relação dose administrada *versus* concentração plasmática

Para a aplicação de uma análise em amostras biológicas, a validação é uma tarefa importante, já que os resultados obtidos nestas análises são freqüentemente usados na clínica para diagnósticos e tratamentos de doenças, em estudos farmacocinéticos, toxicológicos, farmacologia clínica e não clínica e estudos ambientais (PENG; CHIOU, 1990).

Conforme definição existente na Farmacopéia Americana, a validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro sendo algumas vezes mencionado como “o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (SWARTZ; KRULL, 1998).

A validação de métodos bioanalíticos é influenciada por agências regulamentadoras como a agência americana FDA (Food and Drug Administration), a inglesa MCA (Medicines Control Agency) e outros órgãos semelhantes (CAUSON, 1997).

Considerando a validação analítica de importância fundamental para as análises em plasma de ratos tratados com fármacos constituintes do esquema ROM, através de CLAE, realizou-se a padronização e validação dos métodos dos três fármacos componentes do esquema (rifampicina, ofloxacina e minociclina).

A relação dose-efeito ou a relação concentração plasmática-efeito é elementos básico na farmacologia experimental. Contudo, na farmacologia clínica a demonstração destas relações

é difícil. Para alguns fármacos, a relação dose-efeito varia consideravelmente entre os pacientes e esta alta variabilidade é principalmente o resultado de uma pobre aderência do paciente ao regime de dosagem ou diferenças na farmacocinética, particularmente na absorção e eliminação. Portanto, em algumas terapias é importante ajustar a dose para se atingir o efeito terapêutico desejado sem correr o risco de toxicidade (RASMUSSEM; BRØSEN, 2000).

No presente trabalho, realizado em ratos, eliminou-se o interferente aderência do paciente, enfatizando a importância da utilização de animais em pesquisas farmacológicas e ou toxicológicas, como descrito por Hammond (1994).

Os fármacos foram administrados por via intraperitoneal, em doses acima daquelas que seriam consideradas terapêuticas para os animais. Tem-se, nesse caso especificamente, o interferente variabilidade biológica inerente a qualquer ser vivo. A relação entre dose administrada e concentração plasmática, então, torna-se instrumento valioso para se eliminar interferentes que antecedem o efeito propriamente dito, ou seja, trabalha-se com a concentração efetivamente responsável pelo efeito ou alteração observados.

Para se correlacionar a dose administrada com concentração plasmática, utilizou-se como metodologia analítica a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

CLAE é uma técnica analítica importante utilizada na monitorização terapêutica de drogas. Ela pode analisar e discriminar simultaneamente drogas e metabólitos com alta exatidão e precisão (GEISE, 1983).

Padronizou-se e validou-se duas metodologias analíticas para os três fármacos componentes do esquema ROM (rifampicina, ofloxacina e minociclina). Tais metodologias mostraram-se satisfatoriamente aplicáveis, com detecção por ultravioleta e etapas de precipitação protéica e extração do fármaco da matriz (plasma) por partição líquido-líquido.

O processo consistiu de precipitação protéica com metanol com extração do fármaco e do padrão interno (sulindaco). Um cromatógrafo líquido equipado com uma coluna de fase

reversa C8, partículas de 5 μ m (125x4nm) foi utilizado. Os fármacos foram eluidos com uma mistura de metanol:tampão acetato 0,25 mol L⁻¹ (pH=3,0 (60 : 40v/v), observando-se um tempo de retenção de 6,5 minutos para a rifampicina e 4,5 para o padrão interno, sulindaco.

Optou-se pela precipitação protéica, pois, nos métodos tradicionais com extração líquido/líquido, não tivemos uma boa recuperação. Após inúmeras tentativas com vários solventes orgânicos, concluímos que a precipitação de proteínas foi o método mais adequado para a determinação da rifampicina. Certificou-se que o fármaco é altamente instável e sofre fácil oxidação, fato este minimizado pelo uso de ácido ascórbico.

O método de precipitação protéica é um método simples, rápido e extremamente eficaz, que demonstra uma ótima recuperação na análise, acima de 80% (Tabela 2).

Os resultados dos ensaios de precisão e exatidão variaram dentro da faixa de 0,77 a 10,45 % (Tabela 1). A curva de calibração foi construída com cinco pontos, estabelecendo uma faixa de concentração de 10 a 200 μ g/mL (Figura 8-A). O limite de quantificação foi de 0,5 μ g/mL (Figura 10) com linearidade de 0,5 até 400 μ g/mL (Figura 9-B). O método mostrou-se bastante seletivo (Figura 8) e específico (Tabela 4). Em todas as curvas construídas, obtivemos um valor de coeficiente de determinação (r^2) de no mínimo 0,99.

Uma outra grande vantagem da metodologia desenvolvida, além da rapidez de análise, foi a quantidade de amostra utilizada (200 μ L) o que contribui muito para a execução de outras análises para o mesmo animal, necessidade esta aplicada para o estudo em questão.

O método desenvolvido para análise simultânea da ofloxacina e da minociclina permitiu analisar com a mesma coluna, fase móvel e etapa de extração, os dois fármacos inclusos no esquema ROM.

O processo consistiu de extração líquido-líquido para os dois fármacos utilizando com solvente o clorofórmio. Um cromatógrafo líquido equipado com uma coluna de fase reversa RP-18, partículas de 5 μ m (125x4nm) foi utilizado. Os fármacos foram eluidos com uma

mistura de acetonitrila:tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ (pH=3,0 , 87 : 13v/v), observando-se um tempo de retenção de 4,4 minutos para a minociclina e 8,9 para a ofloxacina (Figura 11).

O método apresentou uma grande dificuldade com relação a recuperação, fato devido provavelmente a adsorção dos fármacos ou por se tratar de substâncias com valores de pKa diferentes. Este problema foi solucionado pela incorporação ao plasma de tampão fosfato 0,5mol L⁻¹ pH=6,9. Observou-se também, após a recuperação da fase orgânica e secagem no evaporador de amostras, que as mesmas não deveriam permanecer no mesmo até a completa concentração. Concentrou-se até o volume aproximado de 1mL, acondicionando em geladeira, secando em corrente de ar e injetando-se no cromatógrafo. Assim, obteve-se uma recuperação acima de 80%, tanto para a minociclina como para a ofloxacina (Tabela 6).

A curva de calibração foi construída com 5 pontos para a minociclina (com faixa de concentração de 0,5 a 20µg/mL) e com 6 pontos para a ofloxacina (com faixa de concentração de 0,5 a 20µg/mL) (Figura 12- A).

Os resultados dos ensaios de precisão variaram dentro da faixa de 6,4 a 15,4% para a minociclina e de 3,6 a 13,5 para a ofloxacina (Tabela 5). A exatidão variou entre 1,7 a 11% para a minociclina e 1,0 a 15,6% para ofloxacina (Tabela 5), valores estes abaixo dos 20% recomendados pela literatura (CHASIN et al., 1998).

O limite de quantificação foi de 0,125µg/mL para ambos os fármacos, com valores de precisão e exatidão abaixo de 20% (Tabela 7 e Figura 13) e com linearidade de 0,5 até 80µg/mL para a ofloxacina e de 0,5 a 40µg/mL para a minociclina (Figura 12-B). O método mostrou-se bastante seletivo (Figura 11) e específico (Tabela 8). Em todas as curvas construídas, obtivemos um valor de coeficiente de determinação (r^2) de no mínimo 0,98.

Ressalta-se assim, que a validação de metodologia simultânea contribui muito para a execução das análises, devido a rapidez e o volume de amostra utilizado (500µL).

Os métodos que foram desenvolvidos e validados tanto para a rifampicina quanto para a ofloxacina e minociclina, se mostraram perfeitamente aplicáveis para a execução do estudo proposto, otimizando de forma considerável a realização das análises dos fármacos em plasma de ratos, quer pelo tempo de análise, quer pelo volume de matriz biológica utilizado.

Segundo Barros e Davino (2003), como a avaliação da exposição a um agente pode ser feita pela medida da dose administrada ou da concentração a que um organismo vivo é submetido, após a validação das metodologias analíticas, quantificou-se a concentração plasmática dos grupos que receberam rifampicina 50, 100 e 200mg/kg, ofloxacina 40, 80 e 160mg/kg e minociclina 10, 20 e 40mg/kg isolados. Ainda, determinou-se a concentração plasmática dos três fármacos associados nas três concentrações: rifampicina 50mg/kg + ofloxacina 40mg/kg + minociclina 10mg/kg (ROM I), rifampicina 100mg/kg + ofloxacina 80mg/kg + minociclina 20mg/kg (ROM II) e rifampicina 200mg/kg + ofloxacina 160mg/kg + minociclina 40mg/kg (ROM III), em esquema de dose única. Comparou-se assim, os valores obtidos dos fármacos que foram administrados isoladamente, com o esquema associado respectivos às suas doses.

Observou-se que a concentração plasmática da rifampicina aumentou de acordo com o aumento da dose administrada (Tabela 9, Figura 14). Esse aumento foi significativo entre as doses de 50 (31,9µg/mL) e 100 (86µg/mL) e 50 e 200mg/kg (93,29µg/mL), não diferindo entre as doses de 100 e 200mg/kg, como esperado.

As prováveis alterações farmacocinéticas, farmacodinâmicas e a variabilidade biológica podem explicar o ocorrido já que, teoricamente, a concentração plasmática deveria dobrar na dose de 200mg/kg.

Comparando RFP50 com ROM I, não observou-se diferenças estatísticas significativas. Contudo, quando comparou-se RFP100 com ROM II e RFP200 com ROM III, observou-se um aumento na concentração plasmática dos esquemas associados, que não diferiram entre si,

fato que pode ser explicado por prováveis diferenças de velocidade nos processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos ou até mesmo por uma interferência na biotransformação e ou excreção da mesma, ou seja, quando a rifampicina foi associada a ofloxacina e a minociclina, a sua concentração plasmática aumentou.

A tabela 10 e figura 15 representam valores para a ofloxacina 40, 80 e 160mg/kg isolada e associada com rifampicina e minociclina. Observou-se um aumento na concentração plasmática em relação à dose administrada, tanto com os fármacos isolados quanto associados. Aumento também evidenciado comparando-se os grupos ROM I, ROM II e ROM III aos grupos isolados, confirmando o que a literatura (NIEMI et al., 2003) esclarece que em administrações agudas a rifampicina pode não funcionar como indutora enzimática para algumas isoformas do citocromo P₄₅₀ (CYP), e da glicoproteína P (Gly-P). Da mesma forma, como observado com a rifampicina, quando a ofloxacina foi associada a rifampicina e a minociclina, as suas concentrações plasmáticas aumentaram consideravelmente.

A minociclina foi administrada nas doses de 10, 20 e 40mg/kg, e observou-se elevação proporcional na concentração plasmática com o aumento da dose (Tabela 11 e Figura 16). Porém, quando associada a rifampicina 100 e 200mg/kg (ROM II e III) e a ofloxacina 80 e 160mg/kg (ROM II e III), a concentração plasmática da minocilina sofreu uma redução significativa, contrariamente ao que observou-se com a rifampicina e ofloxacina. O envolvimento de isoformas específicas do CYP na biotransformação dos fármacos em questão, além de um provável envolvimento da glicoproteína-P (GLY-P), podem explicar o ocorrido.

Como evidenciou-se que os efeitos entre as associações entre os fármacos do esquema ROM foram consideráveis a partir da dose intermediária dos mesmos, ou seja, RFP100, OFLX80 e MINO20mg/kg, realizou-se o estudo de doses múltiplas somente com estas doses,

medida adotada para otimizar e direcionar o estudo, evitando ainda sacrifício desnecessário de animais.

A tabela 12 e figura 17 representam valores das concentrações plasmáticas dos fármacos administrados isolados e associados. Observou-se uma redução da rifampicina no esquema associado, um aumento da ofloxacina no mesmo esquema e nenhuma diferença estatisticamente significativa com a minociclina. Provavelmente, o tempo tenha sido fator fundamental para explicar o ocorrido, fato que o envolvimento com o citocromo P₄₅₀, e ou com a glicoproteína P, são dependentes de tempo (NIEMI et al., 2003).

Diferenças interindividuais na oxidação de fármacos são referenciadas como fonte de maior importância na variabilidade da farmacocinética de fármacos, pois esta oxidação é catalisada por enzimas do citocromo P450 e a atividade de metabolização de fármacos do CYP é determinada por fatores que variam de indivíduo para indivíduo, como a disposição genética, fatores ambientais e fatores constitucionais (BRØSEN, 1996).

Magnarin et al. (2004) relatam a importância das interações medicamentosas, relacionando a indução do citocromo P₄₅₀ e da glicoproteína P ao uso da rifampicina, o que pode ser de fato de extrema importância no estudo em questão, visto que, a ofloxacina é eliminada através da Gly-P (RABAA et al., 1996, 1997), e que a toxicidade da minociclina pode estar relacionada a metabólitos formados durante a biotransformação (BOCKER; PETER, 1991).

Logicamente estas são suposições que exigem maiores estudos para a conclusão completa da questão, mas isso também ressalta a grande importância da relação de efeito ou prováveis alterações, com a concentração plasmática e não com a dose administrada, o que facilita o entendimento de alguns processos, eliminando interferências significativas.

- Parâmetros Bioquímicos

Demonstrou-se os valores dos grupos na forma de *blox-plots*, o qual permite uma visualização mais clara dos dados, evidenciando a variação entre os valores do grupo, bem como valores de médias e medianas. Como descrito no item Material e Métodos, realizou-se a comparação entre as médias, já que os valores tiveram que sofrer um ajuste através de análise estatística adequada, o que nos certifica a necessidade extrema da aplicação da ferramenta estatística de forma a permitir uma interpretação fidedigna dos resultados.

A figura 18 representa o parâmetro ALT, onde se observa um aumento nos valores no grupo da rifampicina isolada quando comparada aos grupos controle e ROM. Os grupos tratados com ofloxacina e minociclina demonstraram oscilações em todos os tratamentos, o que nos não nos possibilita uma interpretação estreita para os achados, podendo estar mais relacionadas a variabilidade individual. Com o grupo ROM, observou-se um aumento significativo nos valores em comparação com o grupo controle, somente na maior dose utilizada (ROM III).

Da mesma forma no parâmetro AST (Figura 19), observou-se um aumento nos valores para os grupos tratados com a rifampicina quando comparada com o grupo controle nas três doses administradas, fato também observado com os grupos ROM. Nesta comparação a ofloxacina e minociclina demonstraram uma redução somente quando comparados com os grupos ROM, com exceção da ofloxacina que demonstrou uma redução também com relação ao grupo controle, na menor dose (Figura 19-A).

No parâmetro fosfatase alcalina (Figura 20) obteve-se valores isolados de diferenças consideráveis, com a ofloxacina 40mg/kg (Figura 19-A), demonstrando uma redução comparada ao grupo controle, e com a rifampicina 100mg/kg (Figura 19-B).

Todos os grupos sofreram uma redução nos níveis da gama-glutamilttransferase (Figura 21), quando comparados com o grupo controle, e o grupo rifampicina 100mg/kg (Figura 21-B), demonstrando-se superior ao grupo Rom II.

Observou-se uma redução das proteínas totais (Figura 22) nos grupos que receberam a rifampicina isolada comparando-a com o grupo controle, e com os grupos ROM. A ofloxacina e minociclina apresentaram valores com disparidade, e os grupos ROM, apenas na figura 21-C, observa-se um aumento comparado com o grupo controle. Já no parâmetro albumina (Figura 23), observa-se resultados bastante controversos entre os grupos nos diferentes esquemas de dosagem, exceto com a rifampicina isolada, que apresentou um perfil semelhante demonstrando valores menores comparada ao grupo controle e aos grupos ROM.

A figura 24 demonstra resultados da bilirrubina total, onde se vê um aumento nos níveis em todos os grupos que receberam a rifampicina em relação com o grupo controle, e também dos grupos ROM comparados com o grupo controle. Novamente a ofloxacina e minociclina demonstraram valores com variações aleatórias. Um perfil bem semelhante observou-se na figura 25 no parâmetro bilirrubina direta.

Observou-se aumento considerável na concentração de uréia (Figura 26) nos grupos que receberam a rifampicina, principalmente na dose de 100 e 200mg/kg isolada, comparadas com o grupo controle e com os grupos ROM, que também demonstraram aumentos significativos comparados ao grupo controle. Observa-se um aumento nos níveis de creatinina sérica (Figura 27) com os grupos que receberam a rifampicina isolada, comparados com o grupo controle e com os grupos ROM, onde os demais fármacos demonstraram valores bem dispersos.

A figura 28 ilustra os valores do parâmetro amilase, onde os resultados obtidos demonstraram diferenças com grande variabilidade.

De acordo com o exposto, tivemos uma grande dificuldade de interpretação dos resultados, visto que o fato de se trabalhar com três fármacos, estabelecendo comparações

duplas para cada um, compromete uma correlação mais precisa. Porém, pode-se considerar nos parâmetros bioquímicos de dose única, que os animais que receberam os fármacos, demonstraram alterações hepáticas, que provavelmente estão relacionadas principalmente a rifampicina. Essa colocação é baseada na elevação nos valores de ALT e AST, sugerindo alteração no sistema hepatobiliar, fato observado em estudos de Ohkawa et al. (2002), que relataram aumento nos níveis de AST e ALT em crianças utilizando fármacos para o tratamento de tuberculose, onde a rifampicina estava associada a pirazinamida e isoniazida.

Lau (1995) constatou em um paciente chinês com hanseníase que fazia uso de dapsona e rifampicina, a ocorrência de hepatite, nefrite intersticial e miocardite atribuindo a causa da morte a interação efetuada.

Ainda os valores relacionados ao parâmetro fosfatase alcalina não são conclusivos, visto que as alterações não foram observadas de forma homogênea, podendo tais alterações não terem uma importância clínica significativa, fato observado também com o parâmetro gama-glutamilttransferase. Uma redução nas proteínas totais foi observada para animais que receberam a rifampicina e a minociclina, sugerindo comprometimento na síntese das mesmas, sendo a observação mantida para a rifampicina no parâmetro albumina, provavelmente pela mesma causa. Um aumento nos níveis de bilirrubina total e direta também sugere um provável dano hepático, principalmente nos animais que receberam a rifampicina e o esquema ROM. O parâmetro amilase não nos permite estabelecer conclusões pelos valores discrepantes apresentados entre os grupos.

Com relação aos parâmetros de avaliação de função renal, a uréia se apresentou elevada de forma uniforme tanto para os grupos que receberam a rifampicina isolada quanto para aqueles que receberam o esquema ROM, fato observado também para a creatinina, especificamente para as dosagens intermediárias (RFP100 e ROM II), sugerindo também prováveis alterações renais, ocasionadas muito provavelmente pela rifampicina.

Na análise dos parâmetros bioquímicos em esquema de doses múltiplas, os achados para o parâmetro ALT não foram conclusivos, com resultados que não expressam diferenças marcantes e homogêneas (Figura 43) e o parâmetro AST demonstrou elevação somente no grupo rifampicina 100mg/kg (Figura 44). Para o parâmetro ALP todos os grupos apresentaram valores menores aos do grupo controle, o mesmo observado com o parâmetro gama-glutamilttransferase (Figura 46), o que impossibilita assegurar a existência de lesão hepática. O parâmetro proteínas totais (Figura 47) e albumina (Figura 48) não demonstraram diferenças homogêneas que possam ser consideráveis clinicamente. Já os parâmetros bilirrubina totais e direta (Figuras 49 e 50) evidenciam aumento nos valores dos grupos que receberam a rifampicina, ofloxacina e ROM, sugerindo um dano hepatobiliar. Com o parâmetro amilase (Figura 53), as alterações são insuficientes para estabelecer relação com comprometimento pancreático relacionado ao uso dos fármacos.

Em relação aos parâmetros de avaliação renal, os níveis de uréia e creatinina não demonstraram diferenças suficientes para se concluir que ocorreu um comprometimento renal (Figuras 51 e 52).

Assim, o esquema de doses múltiplas também direciona para um provável comprometimento hepático relacionado com os valores de bilirrubina total e direta, sendo dados, portanto, insuficientes para uma conclusão precisa.

Melde (2001) fez relato de um paciente que recebeu ofloxacina por via oral e apresentou necrose epidermal tóxica, uma dermatite bolhosa rara, porém, fulminante. O autor relata que, mesmo sendo uma reação rara e de origem idiossincrática, a mesma levou o paciente a óbito.

Min et al. (1992) relataram um caso de falência hepática aguda associada com minociclina administrada por via oral durante quatro semanas. Concluíram que a causa teve origem idiossincrática, onde se observou alterações hepáticas e prolongamento do tempo de protrombina (TP), sugerindo dano hepatocelular.

Mesmo as diferenças não sendo homogêneas com a ofloxacina e minociclina elas podem ter uma origem idiossincrásica, podendo perfeitamente induzir alterações hepáticas e ou renais ocasionalmente.

- Parâmetros Hematológicos e Hemostáticos

Nos parâmetros hematológicos série vermelha em esquema de dose única, observamos na figura 29, no parâmetro hematócrito, um aumento na porcentagem dos mesmos nos grupos ROM, comparado com o grupo controle. Com relação aos eritrócitos (figura 30), um aumento nos valores, nos grupos que receberam rifampicina e ROM II e III, comparados com o grupo controle. A hemoglobina (Figura 31) demonstra elevação nos grupos que receberam rifampicina 100mg/kg, ROM II e III. O parâmetro VCM demonstra redução dos grupos dos animais que receberam a rifampicina quando comparados com o grupo controle e com os grupos ROM (Figura 32), o mesmo acontecendo com o parâmetro HCM (Figura 33). O parâmetro CHCM, demonstrou valores aleatórios entre os grupos, com diferenças isoladas (Figura 34).

No esquema de dose única, a série vermelha não sofreu diferenças significativas suficientes para se concluir uma alteração induzida pelos fármacos em questão.

Na série branca, em esquema de dose única, nos parâmetros leucócitos, linfócitos, eosinófilos, monócitos, neutrófilos bastonetes e segmentados as diferenças observadas aconteceram de forma aleatória (Figuras 35, 36, 37, 38, 39 e 40, respectivamente). Tais diferenças não nos permitem assegurar que ocorreu alguma alteração, por insuficiência de dados mais conclusivos e homogêneos.

Com relação aos parâmetros hemostáticos em esquema de dose única (Figura 41), a rifampicina e a minociclina aumentaram o tempo de protrombina, comparadas com o grupo

controle e com os grupos ROM. Em relação ao tempo de tromboplastina parcial ativado (Figura 42), as diferenças também foram muito discrepantes e isoladas.

A série vermelha no esquema de doses múltiplas (Figuras 54, 55, 56, 57, 58 e 59), também não demonstrou diferenças que possam conduzir a uma conclusão específica com a utilização dos fármacos pesquisados, o mesmo sendo observado com a série branca (Figuras 61 a 66).

Com os parâmetros hemostáticos (TP e TTPA) em esquema de doses múltiplas, a variação dos valores também é aleatória e insuficiente para conclusões específicas e direcionadas (Figuras 67 e 68).

- Parâmetros Histopatológicos

As análises hisopatológicas, representam ferramenta importante para identificação de prováveis efeitos tóxicos em nível celular de uma forma mais específica e objetiva.

Realizou-se os estudos morfológicos com observação de lâminas de tecido hepático para uma conclusão mais direcionada da hepatotoxicidade induzida pelos fármacos que compõem o esquema ROM.

A figura 68 e 69 demonstra o aspecto histológico de animais que receberam água destilada, que foi comparado posteriormente com o grupo que nos serviu de controle (DMSO), representado nas figuras 70 e 71. Pode-se observar que o DMSO por si só já demonstrou uma ação hepatotóxica, o que a princípio poderia excluí-lo de ser utilizado como grupo controle. Porém, para assegurar que as diferenças seriam fidedignas entre os grupos tratados e o grupo controle (DMSO), realizou-se estudos cariométricos e estereológicos que comprovaram a possível utilização do grupo DMSO, como controle.

Com relação aos grupos tratados em esquema de dose única a rifampicina induziu a alterações hepáticas nas três doses utilizadas comparada com o grupo controle, (Figuras 72,

73 e 74, fato comprovado estatisticamente pela cariometria e estereologia (Tabelas 13 e 22, respectivamente). A hepatotoxicidade da rifampicina já havia sido observada no rato por Sodhi et al., (1997a). Quando a rifampicina era associada a isoniazida, a associação provocava esteatose hepática no rato (SODHI et al., 1997b). Também Souza et al., (1997) observaram necrose hepática hemorrágica em pacientes com hanseníase tratados com o fármaco. O dano hepático também foi observado “in vitro” no rato por Khedun et al. (1992). Com a ofloxacina, um achado bem semelhante foi observado, principalmente nas doses de 80 e 160mg/kg, (Figuras 76 e 77 e Tabelas 14 e 23). O mesmo foi constatado com a minociclina, principalmente das doses de 20 e 40mg/kg (Figuras 79 e 80, e Tabelas 15 e 24). No esquema associado (ROM), observou-se alterações significativas nas três doses utilizadas (Figuras 81, 82 e 83 e Tabelas 16 e 25). Comparando-se os fármacos isolados com os mesmos associados, observa-se algumas diferenças em parâmetros ora semelhantes, ora distintos o que evidencia que nem sempre a associação medicamentosa entre os mesmos possa assumir e representar um risco superior em todas as circunstâncias (Tabelas 17, 18, 19, 26, 27 e 28).

Para o esquema de doses múltiplas as figuras 84, 85, 86 e 87, demonstram que os fármacos quer administrados em dose única quer em doses múltiplas, induziram uma alteração hepática muito significativa, quando os grupos tratados foram comparados com os grupo controle (Tabelas 20 e 29). Quando os grupos tratados com os fármacos isolados foram comparados com o grupo ROM, obteve-se diferenças significativas somente na cariometria, o que não aconteceu com a estereologia (Tabela 30).

Com tais evidências, pode-se relatar através das alterações uma hepatotoxicidade induzida pela rifampicina, ofloxacina e minociclina, administradas de forma isolada e associadas, nas doses propostas, colocando a histopatologia como instrumento valioso no auxílio a investigação de reações adversas a fármacos. Há que se lembrar que esses fármacos têm atividade hepatotóxica (LAWRENSON et al., 2000; RUEF; BLASER, 2000).

6 CONCLUSÕES

▪ METODOLOGIAS ANALÍTICAS

- Os métodos desenvolvidos para quantificação da rifampicina, ofloxacina e minociclina em plasma de ratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência se mostraram adequados e aplicáveis para estabelecer correlação com a dose administrada.

Dose única

- A concentração plasmática da rifampicina aumentou quando associada a ofloxacina e minociclina, em dois regimes de dosagem, comparada com o fármaco isolado;

- A concentração plasmática da ofloxacina aumentou quando associada a rifampicina e a minociclina, em todos os regimes de dosagem, comparada com o fármaco isolado;

- A concentração plasmática de minociclina diminuiu quando associada a rifampicina e a ofloxacina em dois regimes de dosagem, comparada com o fármaco isolado.

Doses múltiplas

- A concentração plasmática da rifampicina diminuiu quando associada a ofloxacina e a minociclina, comparada ao fármaco isolado;

- A concentração plasmática da ofloxacina aumentou quando associada a rifampicina e a minociclina, comparada ao fármaco isolado;

- A concentração plasmática da minociclina não se alterou comparando-se o esquema associado com o isolado.

- Provavelmente interferências na farmacocinética estejam relacionadas a tais diferenças entre as concentrações plasmáticas comparando esquema de dose única com doses múltiplas.

- O conhecimento da correlação entre dose administrada e concentração plasmática demonstra extrema importância para estudos dessa natureza.

▪ PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Dose única

- Observou-se uma alteração hepática provavelmente no sistema hepato biliar, nos animais que receberam a rifampicina e o esquema ROM em dose única;

- Uma alteração renal também foi observada nos animais que receberam a rifampicina e o esquema ROM.

- Provavelmente a rifampicina esteja relacionada a tais alterações hepáticas e renais.

Doses múltiplas

- Não foram evidenciadas alterações significativas e direcionadas ao uso dos fármacos em questão, no esquema de doses múltiplas.

▪ PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E HEMOSTÁTICOS

Não observou-se homogeneidade entre as diferenças observadas, o que não nos permite estabelecer uma relação entre as diferenças, e o uso dos fármacos, nos esquemas de doses única e múltipla, na promoção de alterações hematológicas e hemostáticas.

▪ PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

- Os fármacos administrados isolados e associados, induziram alterações hepáticas em esquema de dose única e múltipla, traduzidas por vacuolização citoplasmática dos hepatócitos, necrose liquefativa, inflamação crônica, vasos dilatados e congestos e desorganização portal.

7 REFERÊNCIAS*

AGRAWAL, S.; SINGH, I.; KAUR, K.J.; BHADDE, S.; KAUL, C.L.; PANCHAGNULA, R. Bioequivalence trials of rifampicin containing formulations: extrinsic and intrinsic factors in the absorption of rifampicin. **Pharmacol. Res.**, London, v. 50, p. 317-27, 2004.

ALANGADEN G.J.; LERNER, S.A. The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.25, n.5, p.1213-21, 1997.

ALI, M.S.; GHORI, M.; SAEED, A. Simultaneous determination of ofloxacin, tetrahydrozoline hydrochloride, and prednisolone acetate by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. Sci.**, Evanston, v.40, n.8, p.429-33, 2002.

AMACHER, D.E. Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, New York, v.27, n.2, p.119-30, 1998.

AMENT, P.W.; BERTOLINO, J.G.; LISZEWSKI, J.L. Clinically significant drug interactions. **Am. Fam. Physician**, Kansas City, v.15;61, n.6, p.1745-54, 2000.

ARAÚJO, M.G. Hanseníase no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.36, n.3, p.373-82, 2003.

BAIN, B.J. **Células sanguíneas** um guia prático. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. cap.8, p.204-274.

BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. cap.1.5., p.59-67.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARTOSEK, I.; GUAITANI, A.; PACEI, E. **Animals in toxicological research**. New York: Ravess Press, 1982.

BEHMER, O.A.; CASTRO DE TOLOSA, E.M.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 1976.

BELL, W.N.; ALTON, H.G. Brain extract as substitute for platelet suspensions in thromboplastin generation test. **Nature**, London, v.174, p.880-1, 1954.

BISHOP, M.L.; DUBEN-ENGELKIRK, J.L.; FODY, E.P. **Clinical chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

BOCKER, R.H.; PETER, R.; MACHBERT, G.; BAUER, W. Identification and determination of the two principal metabolites of minocycline in humans. **J. Chromatogr.**, New York, v.568, p.363-74, 1991.

BOFFITO, M.; TIJA, J.; REYNOLDS, H.E.; HOGGARD, P.G.; BONORA, S.; Di PERRI, G.; BACK, D.J. Simultaneous determination of rifampicin and efavirenz in plasma. **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 24, n.5, p.670-4, 2002.

BOWERS, M.L.; DUBEN-ENGELKIRK, J.L.; FODY, E.P. **Clinical chemistry**. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. **Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária. Controle da hanseníase : uma proposta de integração ensino-serviço**. Rio de Janeiro : DNDSNUTES, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. DGPE. **Guia para implantar/implementar as atividades de controle da hanseníase nos planos estaduais e municipais de saúde**. Brasília , 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. **Normas Técnicas para Eliminação da hanseníase no Brasil.** Brasília, 2001.

BRITTON, W.J.; LOCKWOOD, D.N. Leprosy. **Lancet**, Boston, v.363, p.1209-19, 2004.

BRØSEN, K. Drug-metabolizing enzymes and therapeutic drug monitoring in psychiatry. **Ther. Drug Monit.**, New York, v.18, p. 393-396, 1996.

CALLEJA, I.; BLANCO-PRÍETO, M.J.; RUZ, N.; RENEDO, M.J.; DIOS-VIÉITEZ, M.C. High-performance liquid-chromatographic determination of rifampicin in plasma and tissues. **J. Chromatogr. A.**, Amsterdam, v.1031, p.289-94, 2004.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 689, p.175 - 180, 1997.

CHALKLEY, H.W. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 4, p. 47-53, 1943.

CHAMBERS, H.F. Proteins synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. In: GILMAN, A.; GOODMAN, L.S.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **The pharmacological basis of therapeutics.** 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap.47, p. 1239-1271.

CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADORI, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev. Bras. Toxicol.**, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

COLLETT, A.; TANIANIS-HUGHES, J.; WARHURST, G. Rapid induction of P-glycoprotein expression by high permeability compounds in colonic cells in vitro: a possible source of transporter mediated drug interactions? **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.68, p.783-90, 2004.

COLMAN, R.W.; HIRSH, J.; MARDER, V.S.; SALZMAN, E.W. **Hemostasis on thrombosis**: basic principles and clinical practice. 3rd.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1994.

COLOVIC, M.; CACCIA, S. Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. **J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.**, Amsterdam, v.791, p.337-43, 2003.

CONOVER, W.J. **Practical nonparametric statistics**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.

CONTE, J.E. Jr.; LIN, E.; ZURLINDEN, E. Liquid chromatographic determination of rifampicin in human plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and alveolar cells. **J. Chromatogr. Sci.**, Evanston, v.38, n.2, p.72-6, 2000.

COSTA, M.B.; CAVALCANTI NETO, P.F.; MARTELLI, C.M.; STEFANI, M.M.; MACEIRA, J.P.; GOMES, M.K.; SCHETTINI, A.P.; REBELLO, P.F.; PIGNATARO, P.E.; UEDA, E.S.; NARAHASHI, K.; SCOLLARD, D.M. Distinct histopathological patterns in single lesion leprosy patients treated with single dose therapy (ROM) in the Brazilian Multicentric Study. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, Washington, v.69, n.3, p.177-86, 2001.

CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BARR, W.T. **Cellular pathology techniques**. 4th.ed. London: Butterworths, 1985.

DE PAZ, S.; PEREZ, A.; GOMES, M.; TRAMPAL, A.; DOMINGUEZ, L.A. Severe hypersensitivity reaction to minocycline. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, Barcelona, v. 9, n.6, p. 403-4, 1999.

DEN BESTEN, C.; VET, J.J.R.M.; BESSELINK, H.T.; KIEL, G.S.; BERKEL, B.J.M.; BEEMS, R.; BLADEREN, P.J. The liver, kidney and thyroid toxicity of chlorinated benzenes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.111, p.69-81, 1991.

DILGER, K.; HOFMANN, U.; KLOTZ, U. Enzyme induction in the elderly: Effect of rifampin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of propafenone. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v.67, p.512-20, 2000.

DOUMAS, B.T.; WATSON, W.A.; BIGGS, H.G. Albumin standart and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v.31,p.87-96, 1971.

DUKES, M.N.G. **Meyler's**: side effects of drugs. 10th.ed.Amsterdam: Elsevia, 1984.

EBENEZER, G.J.; JOB, C.K. Histopathological activity in paucibacillary leprosy patients after ROM therapy. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, Washington, v.67, n.4 , p.409-13, 1999.

FERNANDES, E.; TOSTE S.A.; LIMA, J.L.F.C.; REIS, S. The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.35, n.9, p.1008-1017, 2003.

FERNANDES, E.; COSTA, D.; GOMES, A.; REIS, S.; LIMA, J.L.F.C. Hydrogen peroxide scanenging activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Life Sci.**, Oxford, *in press*, 2005.

FINCH, C.K.; CHRISMAN, C.R.; BACIEWICZ, A.M.; SELF, T.H. Rifampin and rifabutin drug interaction: an update. **Arch. Int. Med.**, New York, v.162, n.9, p.985-92, 2002.

FOOTE, E.F.; HALSTENSON, C.E. Effects of probenecid and cimetidine on renal disposition of ofloxacin in rats. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 42, n.2, p.456-58, 1998.

FROMM, M.F. Genetically determined differences in P-glycoprotein function: implications for disease risk. **Toxicology**, Amsterdam, v.181-182, p.299-303, 2002.

GEISE, R.W. Techical considerations in the use of high-performance liquid chromatography in therapeutic drug monitoring. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.29, n.7, p.1331-43, 1983.

GELBER, R.H.; MURRAY, L.P.; SIU, P.; TSANG, M.; REA, T.H. Efficacy of minocycline in single dose and at 100 mg twice daily for lepromatous leprosy. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, Washington, v.62, n.4, p.568-73, 1994.

GIRLING, D.J.; HITZE, H.L. Adverse reactions to rifampicin. **Bull. World Health Organ.**, Geneva, v.57, p.45-9, 1979.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.197, p.751-66, 1949.

GOULART, I.M.B.; ARBEX, G.L.; CARNEIRO, M.H.; RODRIGUES, M.S.; GADIA, R. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.35, n.5, p.453-60, 2002.

GROSSET J.H.; GUELPA-LAURAS, C.C.; PERANI, E.G.; BEOLETTO, C. Activity of ofloxacin against *Mycobacterium leprae* in the mouse. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, Washington, v.56, n.2, p.259-64, 1988.

GROSSET, J.H. Newer drugs in leprosy. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, Washington, v.69, n.2, p.14-8, 2001. Supplement.

GROSSET, J.; LEVENTS, S. Adverse effects of rifampicin. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v.5, p.440-46, 1983.

GUTMANN, I.; BERGMEYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. 2nd.ed. New York: Academic Press, 1974.

HAMMOND, A.C. Animal well-being in pharmacology and toxicology research. **J. Anim. Sci.**, Champaign, n.72, p.523-27, 1994.

HEIMPEL, H. When should the clinician suspect a drug-induced blood dyscrasia, and how should he proceed? **Eur. J. Haematol. Suppl.**, Copenhagen, v.60, p.11-15, 1996.

HENNING, A. Fehler der Oberflächenbestimmung von Kernen bei Endlicher Schnittdick. **Mikroskopie**, Wien, v.12, n.12, p.7-11, 1957.

HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais**. 19. ed. São Paulo: Manole, 1999.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W. **Clinical chemistry** 2nd.ed.New York: Harper & Row, 1974.

HENRY, R.J.; CHIAMORI, N.; GOLUB, O.J.; BERKMAN, S. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-piruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase.**Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v.34,n.4,p.381, 1960.

IMMANUEL, C.; KUMAR, A.K.H. Simple and rapid high-performance liquid chromatography method for the determination of ofloxacin concentrations in plasma and urine. **J.Chromatogr. B.**, Amsterdam, v.760, p. 91-95, 2001.

ISHII, N. Recent advances in the treatment of leprosy. **Dermatol. Online J.**, Davis, v. 9, n.5, p.1-18, 2003.

ITO, T.; YANO, I.; TANAKA, K.; INUI, K.I. Transport of quinolone antibacterial drugs by human P-glycoprotein expressed in a kidney epithelial cell line, LLC-Pk₁¹. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.282, n.2, 955-60, 1997.

JI, B.; PERANI, E.G.; PETINON, C.; GROSSET, J.H. Bactericidal activities of single or multiple doses of various combinations of new antileprosy drugs and/or rifampin against *M.leprae* in mice. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, Washington, v.60, n.4, p.556-61, 1992.

JI, B.; JAMET, P.; PERANI, E.G.; BOBIN, P.; GROSSET, J.H. Powerful bactericidal activities of clarithromycin and minocycline against *Mycobacterium leprae* in lepromatous leprosy. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.168, n.1, p.188-90, 1993.

JI, B.; SOW, S.; PERANI, E.; LIENHARDT, C.; DIDEROT, V.; GROSSET, J. Bactericidal activity of a single-dose combination of ofloxacin plus minocycline, with or without rifampin, against *Mycobacterium leprae* in mice and in lepromatous patients. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.42, n.5, p.1115-20, 1998.

KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. **Clinical chemistry**: theory, analysis and correlation. 4th.ed. St. Louis: C.V. Mosby, 1996.

KAPUSNIK-UNER, J.E.; SANDE, M.A.; CHAMBERS, H.F. Tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, e outros fármacos antibacterianos In: GILMAN, A.; GOODMAN, L.S.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **As bases farmacológicas da terapêutica** 9.ed. México: McGraw-Hill, 1996. cap. 47, p.826-48.

KATO, M.; WEST, H.A.; ASHBY, R.; VIRGO, D.M.; FOWLER, J.S.; FURUHAMA, K.; TAKAYAMA, S. Four-week-sub-acute toxicity study of S-levo-9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7-H-pyrido-[1,2,3-dc] [1,4] benzenoazine-6-carboxylic acid hemihydrate (DR-3355) in CD rats and cynomolgus monkeys. **J. Toxicol. Sci.**, Sapporo, v.16,n.1, p.29-48, 1991.

KATOCH, V.M. Advances in the diagnosis and treatment of leprosy. **Expert Rev Mol Med.**, Cambridge, v.2, p.1-14, 2002.

KHEDUN S.M.; MAHARAJ, B.; LEARY, W.P. The effects of supra-therapeutic doses of rifampicin on liver function in the perfused rat liver. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v.73, n.4, p.449-53, 1992.

KIM, E.; NA, K.J. Effect of sodium dichromate on carbohydrate metabolism. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.110, p.251-8, 1991.

KRAUSE M. Miscellaneous antibacterial drugs: sulfonamides and trimethoprim, tetracyclines, other antimicrobial drugs. In: **DUKES, M.N.G.; ARONSON, J.K. (Ed.) Meyler's Side Effects of drugs**. 14th ed., Amsterdam: Elsevier Science, 2000. cap.26.3, p.896-921.

KREMERS P. Can drug-drug interactions be predicted from in vitro studies ? **Sci. World J.**, Los Angeles, v.19, n.2, p.751-66, 2002.

KURATA, M.; HORII, I. Blood coagulation tests in toxicological studies-review of methods and their significance for drug safety assessment. **J.Toxicol. Sci.**, Sapporo, v.29, n.1, p.13-32, 2004.

LAKSHMINARAYAN, S.; SAHN, S.A.; HUDSON, L.D. Massive haemolysis caused by rifampicin. **Br. Med. J.**, London, v.2, n.5861, p.282-3, 1973.

LAU, G. A fatal case of drug-induced multi-organ damage in a patient with Hansen's disease: dapsone syndrome or rifampicin toxicity? **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.73, p.109-115, 1995.

LAU, Y.Y; HANSON, G.D.; CAREL, B.J. Determination of rifampin in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chromatogr B. Biomed. Appl.**, Amsterdam, v.9; 676, n.1, p.147-52, 1996.

LAWRENSON, R.A.; SEAMAN, H.E.; SUNDSTROM, A.; WILLIAMS, T.J.; FARMER, R.D. Liver damage associated with minocycline use in acne: a systematic review of the published literature and pharmacovigilance data. **Drug Saf.**, Mairangi Bay, v.23, n.4, p.333-49, 2000.

LILJA, J.J.; NIEMI, M.; NEUVONEN, P.J. Rifampicin reduces plasma concentrations of celiprolol. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 59, p.819-24, 2004.

LIN, J.H.; YAMAZAKI, M. Role of p-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. **Clin. Pharmacokinet.**, New York, v. 42, n.1, p.59-98, 2003.

MACEK, J.; PTACEK, P. Determination of ofloxacin in human plasma using high performance liquid chromatography and fluorescence detection. **J. Chromatogr. B.**, Amsterdam, v.17, n.2, p.316-9, 1995.

MAGNARIN, M.; MORELLI, M.; ROSATI, A.; BARTOLI, F.; CANDUSSIO, L.; GIRALDI, T.; DECORTI, G. Induction of proteins involved in multidrug resistance (P-glycoprotein, MRP1, MRP2, LRP) and of CYP 3A4 by rifampicin in LLC-PK₁ cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v.483, p.19-28, 2004.

MAJUMDER, V.; SAHA, B.; HAJRA, S.K.; BISWAS, S.K.; SAHA, K. Efficacy of single-dose ROM therapy plus low-dose convit vaccine as an adjuvant for treatment of paucibacillary leprosy patients with a single skin lesion. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, Washington, v.68, n.3, p.283-90, 2000.

MANDELL, G.L.; PETRI, W.A. Drugs used in the chemotherapy of tuberculosis, *Mycobacterium avium* complex disease, and leprosy. In: HARDMAN, J.G.; GOODMAN GILMAN, A.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw Hill, 1996. cap. 48, p. 1169-74.

MANE I.; CARTEL, J.L.; GROSSET, J.H. Field trial on efficacy of supervised monthly dose of 600 mg rifampicin, 400 mg ofloxacin and 100 mg minocyclin for the treatment of leprosy; first results. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, Washington, v.65, n.2, p.224-9, 1997.

MASCHER, H.J. Determination of minocycline in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection after liquid-liquid extraction. **J. Chromatogr. A.**, Amsterdam, v.3;812, n.1-2, p.339-42, 1998.

MATSUNAGA, T.; MARUYAMA, M.; HARADA, E.; KATSUYAMA, Y.; SUGIHARA, N.; ISE, H.; NEGISHI, N.; IKEDA, U.; OHMORI, S. Expression and induction of CYP3As in human fetal hepatocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v.318, p.428-34, 2004.

McCULLAGH P.; NELDER J.A. **Generalized linear models**. 2nd ed. London: Chapman and Hall, 1990.

McLELLAN, R.A.; DROBITCH, R.K.; MONSHOUWER, M.; RENTON, K.W. Fluoquinolone antibiotics inhibit cytochrome P450-mediate microsomal drug metabolism in rat and human. **Drug Metab. Dispos.**, Bethesda, v.24, n.10, p.1134-8, 1996.

MELDE, S.L. Ofloxacin: a probable cause of toxic epidermal necrolysis. **Ann. Pharmacother.**, Cincinnati, v.35, p.1388-90, 2001.

MERZ, W.A. Die streckenmessung an gerichteten Strukturen im Mikroskop und the anwendining zur bestimmung von Oberflachem – Volumen Relationen im knochengewebe. **Mikroskopie**, Wien, v.22, n.5/6, p.132-42, 1968.

MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. **Laboratório para o clínico**. São Paulo: Atheneu, 1999.

MIN D.I.; BURKE, P.A.; LEWIS, W.D.; JENKINS, R.L. Acute hepatic failure associated with oral minocycline: a case report. **Pharmacotherapy**, Carlisle, v. 12, n.1, p.68-71, 1992.

NIEMI, M.; BACKMAN, J.T.; NEUVONEN, M.; NEUVONEN, P.J.; KIVISTO, K.T. Effects of rifampicin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide and glizipide. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v.69, n.6, p.400-6, 2001.

NIEMI, M.; BACKMAN, J.T.; FROMM, M.F.; NEUVONEN, P.J.; KIVISTO, K.T. Pharmacokinetic interactions with rifampicin. **Clin. Pharmacokinet.**, New York, v.42, n.9, p.819-50, 2003.

OHKAWA, K.; HASHIGUCHI, M.; OHNO, K.; KIUCHI, C.; TAKAHASHI, S.; KONDO, S.; ECHIZEN, H.; OGATA, H. Risk factors for antituberculous chemotherapy-induced hepatotoxicity in Japanese pediatric patients. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v.72, n.2, p.220-6, 2002.

ORISAKWE, O.E.; AGBASI, P.U.; OFOEFULE, S.I.; ILONDU, N.A.; AFONNE, O.J.; ANUSIEM, C.A.; ILO, C.E.; MADUKA, S.O. Effect of pefloxacin on the Urinary Excretion of Rifampicin. **Am. J. Ther.**, New York, v.11, n.1, p.13-16, 2004.

ORTI V.; AUDRAN, M.; GIBERT, P.; BOUGARD, G.; BRESSOLLE, F. High- performance liquid chromatographic assay for minocycline in human plasma and parotid saliva. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.738, n.2, p.357-65, 2000.

PAINE, M.F.; WAGNER, D.A.; HOFFMASTER, K.A.; WATKINS, P.B. Cytochrome P450 3A4 and glycoprotein mediate the interaction between an oral erythromycin breath test and rifampin. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v.72, n.5, p.524-35, 2002.

PENG,G.W.; CHIOU,W.L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. **J. Chromat.**, Amsterdam, v.531, p.131-180, 1990.

PETRI, W.A. Jr. Drugs used in the chemotherapy of tuberculosis, *Mycobacterium avium* complex disease, and leprosy. In: GILMAN, A.; GOODMAN, L.S.; HARDMAN, J.G; LIMBIRD, L.E. **The pharmacological basis of therapeutics**. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. Cap.48, p. 1273-1294.

POMMIER, F.; SIOUFI, A.; GODBILLON, J. Simultaneous determination of imipramine and its metabolite desipramine in human plasma by capillary gas chromatography with mass-selective detection. **J. Chromat. B**, Amsterdam, v. 703, p. 147-158, 1997.

QUEIROZ, R.H.C.; DE SOUZA, A.M.; SAMPAIO, S.V.; MELCHIOR, E. Biochemical and hematological side effects of clofazimine in leprosy patients. **Pharmacol. Res.**, London, v.46, n.2, p.191-194, 2002.

QUICK, A.J. The nature of the bleeding in jaundice. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.110, p.1658, 1938.

RABBAA, L.; DAUTREY, S.; COLAS-LINHART, N.; CARBON, C.; FARINOTTI, R. Intestinal elimination of ofloxacin enantiomers in the rat: evidence of a carrier-mediated process. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.40, n.9, p.2126-30, 1996.

RABBAA, L.; DAUTREY, S.; COLAS-LINHART, N.; CARBON, C.; FARINOTTI, R. Absorption of ofloxacin isomers in the rat small intestine. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.41, n.10, p.2274-77, 1997.

RAMOS e SILVA, M.; REBELLO, P.F. Leprosy. Recognition and treatment. **Am. J. Clin. Dermatol.**, Auckland, v.2, n.4, p.203-11, 2001.

RASMUSSEN, B.B.; BRØSEN, K. Is Therapeutic Drug Monitoring a case for optimizing clinical outcome and avoiding interactions of selective serotonin reuptake inhibitors? **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 22, p. 143-154, 2000.

RAVEL, R. **Laboratório clínico – aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

REICHLING, J.J.; KAPLAN, M.M. Clinical use of serum enzymes in liver disease. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v.33, n.12, p.1601, 1988.

RIDTITID, W.; WONGNAWA, M.; MAHATTHANATRAKUL, W.; PUNYO, J.; SUNBHANICH, M. Rifampin markedly decreases plasma concentrations of praziquantel in healthy volunteers. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v.72, n.5, p.505-13, 2002.

RODRIGUES, E.R. **Ensaio pré-clínico da cubebina**. 126f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

ROYER, R.J. Adverse drug reactions with fluoroquinolones. **Therapie**, Paris, v.51, n.4, p.414-6, 1996.

RUEF C.; BLASER J. Miscellaneous antibacterial drugs: aminoglycosides, chloramphenicol and thiamphenicol, fluoroquinolones, glycopeptides. In: **DUKES, M.N.G.; ARONSON, J.K. (Ed.) Meyler's Side Effects of drugs**, 14th. ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2000. cap. 26.1, p.852-856.

SAIMA, S.; FURUIE, K.; YOSHIMOTO, H.; FUKUDA, J.; HAYASHI, T.; ECHIZEN, H. The effects of rifampicin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of orally administered nilvadipine to healthy subjects. **Br.J.Clin.Pharmacol.**, London, v.53, n.2, p.203-6, 2002.

SALA, M.A.; LOPES, R.A.; MATHEUS, M. Método morfológico para analisis cuantitativo de los tejidos. Determinación de los parâmetros normales para el hepatocito de rata. **Arch.Fac.Med.Zaragoza**, Zaragoza, v.32, n.1, p.29-31, 1992.

SALA, M.A.; KOMESU, M.C.; LOPES, R.A.; MAIA CAMPOS, G. Karyometric study of basal cell carcinoma. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 1, p.11-14, 1994.

SALPHATI, L.; BENET, L.Z. Modulation of P-glycoprotein expression by cytochrome P450 3A inducers in male and female rato livers. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.55, p.387-395, 1998.

SAMPOONACHOT, P.; BUNDIT, C.; KUHACHAROEN, N.; PEERAPAKORN, S.; KAMPIRAPAP, K.; POOMLEK, A.; BAMPENYU, S.; TIASIRI, S.; RUNGRUANG, S.; SURASONDHI, S.; SUPANWANIT, S.; WIRIYAWIPART, S. Ofloxacin containing combined drug regimens in the treatment of multibacillary leprosy. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, Washington, v.28, n.4, p.803-10, 1997.

SIMS, F.H.; HORN, C. Some observations on Powell's methods for the determination of serum bilirubin. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v.29, p.412-7, 1958.

SMITH, P.J.; van DYK J.; FREDERICKS A. Determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide by high performance liquid chromatography after their simultaneous extraction from plasma. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, Paris, v.3, n.11, p.51-2, 1999. Supplement 3.

SODHI, C.P.; RANA, S.; MEHTA, S.; VAIPHEI, K.; GOEL, R.C.; MEHTA, S.K. Study of oxidative-stress in rifampicin-induced hepatic injury in growing rats with and without protein-energy malnutrition. **Hum. Exp. Toxicol.**, London, v.16, n.6, p.315-21, 1997a.

SODHI, C.P.; RANA, S.; MEHTA, S.; VAIPHEI, K.; ATTARI, S.; MEHTA, S. Study of oxidative-stress in isoniazid-rifampicin induced hepatic injury in young rats. **Drug Chem. Toxicol.**, New York, v.20, n.3, p.255-69, 1997b.

SOUZA, C.S.; ALBERTO, F.L.; FOSS, N.T. Disseminated intravascular coagulopathy as an adverse reaction to intermittent rifampin schedule in the treatment of leprosy. **Int. J. Lepr.**, Washington, v.65, n.3, p.366-71, 1997.

STROLIN, B.M.; DOSTERT, P. Induction and autoinduction properties of rifamycin derivatives: a review of animal and human studies. **Environ. Health Perspect.**, Research Triangle Park, v.102, p.101-5, 1994. Supplement 9.

SZASZ, G. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyltranspeptidase. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.15, n.2, p.124, 1969.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Tech.**, New York, p.12-18, jun.1998.

TAMANO, S.; KURATA, Y.; SHIBATA, M.; TANAKA, H.; OGISO, T.; ITO, N. 13-week oral toxicity study of captafol in f344/DuCrj rats. **Fundam. Appl. Toxicol.**, Orlando, v.17, n.2, p.390-8, 1991.

UNITED STATES. Department of Health and Human services AND HUMAN SERVICES; FDA; CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. **Guidance for industry: Bioanalytical Methods Validation for Human Studies**. New York, 1998.

VAN DEN BROEK, J.M.; TEUNISSEN, M.W.; BREIMER, D.D. Induction of hexobarbital and antipirine metabolism by rifampicin treatment in the pig. **Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.**, New York, v.9, n.6, p.541-44, 1981.

VIJAYAKUMARAN, P.; MANIMOZHI, N.; JESUDASAN, K.; ARUNTHATHI, S.; JACOB, M.; SAMUEL, P. Leucocytopenia after rifampicin and ofloxacin therapy in leprosy. **Lepr. Rev.**, London, v.68, n.1, p.10-5, 1997.

WEBER, A.; KAPLAN, M.; CHUGHTAI, S.A.; COHN, L.A.; SMITH, A.L.; UNADKAT, J.D. CYP3A inductive potential of the rifamycins, rifabutin and rifampin, in the rabbit. **Biopharm. Drug Dispos.**, Chichester, v.22, n.4, p.157-68, 2001.

WEIBEL, E.R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. **Int. Rev. Cytol.**, New York, v. 26, p. 235-302, 1969.

WESTPHAL, K.; WEINBRENNER, A.; ZSCHIESCHE, M.; FRANKE, G.; KNOKE, M.; OERTEL, R.; FRITZ, P.; Von RICHTER, O.; WARZOK, R.; HACHENBERG, T.; KAUFFMANN, H.M.; SCHRENK, D.; TERHAAG, B.; KROEMER, H.K.; SIEGMUND, W. Induction of P-Glycoprotein by rifampicin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: A new type of drug/drug interaction. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v.68, p.345-55, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report of the first meeting of the WHO Technical Advisory Group on Elimination of leprosy**. Geneva, 2-3 May 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leprosy elimination project. **Status report 2003**. Geneva, 2004. 41p.

YOUNG, D.S. **Effects of drugs on clinical laboratory test**. Washington: Academic Press, 2000.

ZENG, S.; ZHONG, J.; PAN, L.; LI, Y. High-performance liquid chromatography separation and quantitation of ofloxacin enantiomers in rat microsomes. **J. Chromatogr. B.**, Amsterdam, v.728, p.151-55, 1999.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain and conscious animals. **Pain**, Amsterdam, v.16, p.109-110, 1983.