UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
RIBEIRÃO PRETO

FLÁVIA APARECIDA PAINA

Alterações hematológicas e hemostáticas induzidas pela
clofazimina e claritromicina em ratos

Ribeirão Preto
2007

FLÁVIA APARECIDA PAINA

Alterações hematológicas e hemostáticas induzidas pela
clofazimina e claritromicina em ratos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
aplicadas à Farmácia para obtenção do título de
Mestre em Biociências aplicadas à Farmácia

Área de concentração: Biociências aplicadas à
Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Souza

Ribeirão Preto
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Paina, Flávia Aparecida

Alterações hematológicas e hemostáticas induzidas pela clofazimina e claritromicina em ratos. Ribeirão Preto, 2007.

127p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Souza, Ana Maria

1. Alterações hematológicas. 2. Clofazimina. 3. Claritromicina.

Flávia Aparecida Paina

Alterações hematológicas e hemostáticas induzidas pela clofazimina e claritromicina em ratos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Prof(a).Dr(a).

Prof(a).Dr(a).

Profa.Dra. Ana Maria de Souza
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
Orientadora

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em...../...../2007.

Dedico esta dissertação

Ao meu marido Anderson, por sua compreensão e apoio incansáveis; por estar sempre perto desde os momentos de felicidade até as horas mais tristes e incertas; pelo incentivo constante e pela oportunidade de me fazer tão feliz com seu amor, carinho, respeito, companheirismo e sinceridade.

À minha mãe, pela vida; por me ensinar, com seu exemplo, a ser uma pessoa de bem, de caráter, e principalmente pela lição de que não há barreiras sociais e nem econômicas que nos impeça de sermos pessoas melhores, desde que lutemos com muita coragem e principalmente fé em Deus.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante, iluminando minha vida, orientando meus caminhos e me dando sabedoria para seguir sempre Seus preceitos.

À professora Ana Maria de Souza, pela oportunidade e confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos e colocações sempre pertinentes, pelo respeito e apoio constantes, pelo discernimento e lucidez que nos direciona, pela virtude tão nobre de saber ouvir. Admirável profissional e ser humano.

À professora Regina Helena Costa Queiroz, pela colaboração neste projeto, pelas orientações e apoio, fundamentais na realização deste trabalho.

Ao professor Marcelo Dias Baruffi, pela colaboração na realização dos exames bioquímicos.

Ao professor Sérgio de Albuquerque, por ceder espaço para o alojamento dos animais.

Ao professor Oswaldo de Freitas, por ceder o microscópio para a fotografia de algumas lâminas.

Às funcionárias Zita Maria de Oliveira Gregório e Solange Bocardo, pela colaboração na realização dos experimentos.

Às funcionárias Sônia Aparecida Carvalho Dreossi e Luisa Helena Dias Costa, pela realização das dosagens de concentrações plasmáticas e exames bioquímicos, respectivamente.

Aos funcionários: Geórgius, pela colaboração nos cuidados com os animais; Ronaldo e Flávia, do biotério da FCFRP, pela boa vontade e atenção.

À amiga Rita de Cássia Figueiredo, pela ajuda significativa na realização dos experimentos, pela amizade, companheirismo e apoio.

Aos colegas do laboratório de Hematologia Clínica: Felipe Saldanha de Araújo, Livia Andrade Cruz, Elaine Patricia Lino Gasparotto e Iêda Maria Martinez Paino, pela convivência agradável e amizade.

À minha amiga Cristiane, pelo apoio e força constantes, me auxiliando em todos os momentos da minha vida em Ribeirão Preto.

A todos os meus amigos do Madrigal-Revivis - coral da USP/Ribeirão, do sexteto Ihu, e das bandas Batuque Vocal e MPBco sem saída, dos quais eu faço parte, que me ajudaram a levar a vida em Ribeirão Preto de uma forma mais leve e poética, em especial o maestro Sergio e os amigos Talita, Valentino, Regina e Eduardo.

A todos os professores queridos da Universidade Federal de Alfenas, que me ensinaram a função tão nobre de ser farmacêutica, com ética e profissionalismo e, acima de tudo, com respeito ao paciente. Em especial, meus agradecimentos à minha amiga e professora Maria de Fátima Sant'Anna, por me orientar no meu trabalho de iniciação científica, quando começava a trilhar os verdadeiros rumos do meu caminho profissional, e também aos professores de Hematologia Clínica, Selmo de Ávila Lima e Stella Maris da Silveira Duarte, através dos quais eu comecei a direcionar o que, de fato, queria seguir na carreira acadêmica.

Aos ratos Wistar, modelos experimentais que involuntariamente doaram suas vidas para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À Capes, pela concessão de bolsa de Mestrado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Eu pedi força...
E Deus me deu dificuldades para me fazer forte.
Eu pedi sabedoria...
E Deus me deu problemas para resolver.
Eu pedi prosperidade...
E Deus me deu cérebro e músculos para trabalhar.
Eu pedi coragem...
E Deus me deu perigos para superar.
Eu pedi amor...
E Deus me deu pessoas com problemas para ajudar.
Eu pedi favores...
E Deus me deu oportunidades.
Eu não recebi nada que pedi...
Mas tive tudo o que precisava.”*

(Trecho do pensamento popular “A lição da borboleta”)

RESUMO

PAINA, F.A. **Alterações hematológicas e hemostáticas induzidas pela clofazimina e claritromicina em ratos**. 2007. 127f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Claritromicina e clofazimina têm sido utilizadas no tratamento da hanseníase e tuberculose e também em infecções pelo complexo *Mycobacterium avium*, complicação comum em pacientes que se encontram em estágios avançados da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Como os dados sobre a toxicidade de esquemas terapêuticos que incluem estes fármacos são escassos, o presente estudo teve como objetivo determinar os efeitos adversos destas terapias, por meio da avaliação dos parâmetros hematológicos, hemostáticos e bioquímicos e a correlação destes parâmetros com as doses testadas e destas com a concentração plasmática dos medicamentos administrados, intraperitonealmente, em ratos machos Wistar, em monoterapia, em regime de doses única (50, 100 e 200mg/kg de peso) e múltipla (100mg/kg). Clofazimina, em regime de dose única, provocou aumento no número de eritrócitos e redução dos índices eritrocitométricos VCM e CHCM. Em regime de dose múltipla, claritromicina provocou aumento de leucócitos e de células mono e polimorfonucleares. Ambos os fármacos, em dose única, parecem inverter a proporção entre células mono e polimorfonucleares. Foi observado aumento do número de células polimorfonucleares e células em degeneração, ocasionados tanto por clofazimina como pela claritromicina. Em regime de dose única, clofazimina e claritromicina prolongaram o TP. Claritromicina, quando administrada em dose múltipla, causou este mesmo efeito e também o prolongamento do TTPA. Os resultados da avaliação da função hepática mostraram resultados inconclusivos com relação às dosagens de AST, ALT e fosfatase alcalina, porém, foi

observado aumento dos níveis plasmáticos de γ -GT provocado pela clofazimina, em regime de dose única. Claritromicina induziu aumento dos níveis de γ -GT, em regime de doses única e múltipla, e provocou elevação de bilirrubinas total e direta, em dose única. Houve aumento das concentrações plasmáticas dos fármacos à medida que as doses administradas aumentaram, apesar da claritromicina exibir um comportamento farmacocinético não-linear. Portanto, clofazimina e claritromicina provocam alterações hematológicas, hemostáticas e bioquímicas e os resultados de concentração plasmática são valiosos para avaliação de efeitos adversos em estudos comparativos de monoterapia e associação entre os medicamentos.

Palavras-chave: Alterações hematológicas. Clofazimina. Claritromicina.

ABSTRACT

PAINA, F.A. **Hematological and hemostatic alterations induced by clofazimine and clarithromycin in rats.** 2007. 127f. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Clarithromycin and clofazimine have been used to treat leprosy and tuberculosis as well as infections of *Mycobacterium avium* complex, an ordinary complication in patients who are in advanced stage of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). As the data about the toxicity of therapeutic schemes including those drugs are scarce, this research had the aim to determine the adverse effects of those therapies, through the evaluation of hematological, hemostatic and biochemical parameters and the relationship between these parameters and doses tested and between doses and plasma concentrations of drugs administered intraperitoneally, in male Wistar rats, in monotherapy, in single (50, 100 and 200mg/kg body wt), and multiple (100mg/kg body wt) doses regime. Clofazimine, in single dose regime, increased the number of erythrocytes, and it decreased the red cells indices MCV and MCHC. In multiple dose regime, clarithromycin increased the number of leukocytes and mononuclear and polymorphonuclear cells. Both the drugs, in single dose, seem to invert the proportion between mononuclear and polymorphonuclear cells. It was observed an increase in the number of polymorphonuclear cells and cells under degeneration caused by clofazimine and clarithromycin. In single dose regime, clofazimine and clarithromycin prolonged PT. When clarithromycin was administered in multiple dose, it brought about this same effect and also it prolonged aPTT. The results of hepatic function evaluation showed inconclusive results about AST, ALT and alkaline phosphatase levels, but it was observed an increase of U-GGT plasma levels provoked by clofazimine, in single dose regime. Clarithromycin brought about an

increase of U-GGT plasma levels, in single and multiple dose regime, and caused an increase of total and direct bilirubin, in single dose. An increase of plasma concentration of drugs was observed as administered doses were increased, though clarithromycin has nonlinear pharmacokinetics behavior. Therefore, clofazimine and clarithromycin induce hematological, hemostatic and biochemical alterations and the results of plasmatic concentration are valuable to evaluate adverse effects in comparative research of monotherapy and association between drugs.

Key words: Hematological alterations. Clofazimine. Clarithromycin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BFU-E	Unidade formadora de <i>burst</i> eritróide
CFU	Unidade formadora de colônia
CFU-E	Unidade formadora de colônia eritróide
CFZ	Clofazimina
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CRT	Claritromicina
CSF	Fator estimulador de colônia
CYP	Citocromo P450
DL	Dose letal
dm	Dose múltipla
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
du	Dose única
EDTA Na ₂	Etilenodiaminotetracetato dissódico
G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocítico
GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulócito-monócito
Gp	Glicoproteína
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
LDH	Lactato desidrogenase
M-CSF	Fator estimulador de colônias monocítico
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-kB	Fator nuclear Kb
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI	Inibidor dos ativadores de plasminogênio
RNA	Ácido ribonucléico
ROM	Rifampicina, ofloxacina e minociclina
sd	Desvio padrão
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TP	Tempo de protrombina
t-PA	Ativador de plasminogênio do tipo tecidual
TPO	Trombopoetina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
VCM	Volume corpuscular médio
γ -GT	Gama-glutamilttransferase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Porcentagem de animais com alterações morfológicas nos eritrócitos do sangue periférico, tratados com clofazimina no esquema de dose única.....	53
Tabela 2 -	Porcentagem de animais com alterações morfológicas nos eritrócitos do sangue periférico, tratados com clofazimina no esquema de dose múltipla....	53
Tabela 3 -	Porcentagem de animais com alterações morfológicas em células nucleadas do sangue periférico, tratados com clofazimina nos esquemas de doses única e múltipla.....	53
Tabela 4 -	Porcentagem de animais com alterações morfológicas nos eritrócitos do sangue periférico, tratados com claritromicina no esquema de dose única.....	56
Tabela 5 -	Porcentagem de animais com alterações morfológicas nos eritrócitos do sangue periférico, tratados com claritromicina no esquema de dose múltipla	56
Tabela 6 -	Porcentagem de animais com alterações em células nucleadas do sangue periférico, tratados com claritromicina nos esquemas de doses única e múltipla.....	56
Tabela 7 -	Concentrações plasmáticas de clofazimina (ng/mL), administrada no esquema de dose única, nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg e 200mg/kg de peso.....	76
Tabela 8 -	Concentrações plasmáticas de clofazimina (ng/mL), administrada no esquema de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso.....	77
Tabela 9 -	Concentrações plasmáticas de claritromicina (µg/mL), administrada no esquema de dose única, nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg e 200mg/kg de peso.....	79
Tabela 10 -	Concentrações plasmáticas de claritromicina (µg/mL), administrada no esquema de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Número de eritrócitos em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	37
Figura 2 -	Concentração de hemoglobina em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	38
Figura 3 -	Valor do hematócrito em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	38
Figura 4 -	Número de eritrócitos em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	39
Figura 5 -	Concentração de hemoglobina em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	40
Figura 6 -	Valor do hematócrito em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	40
Figura 7 -	VCM em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	41
Figura 8 -	HCM em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	42
Figura 9 -	CHCM em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	42
Figura 10 -	VCM em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	43
Figura 11 -	HCM em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	44
Figura 12 -	CHCM em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	44
Figura 13 -	Número de leucócitos em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	45
Figura 14 -	Número de células mononucleares em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	46
Figura 15 -	Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	46

Figura 16 -	Número de leucócitos em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	48
Figura 17 -	Número de células mononucleares em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	48
Figura 18 -	Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	49
Figura 19 -	Número de reticulócitos em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	50
Figura 20 -	Número de reticulócitos em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	51
Figura 21 -	Extensões sangüíneas coradas de animais tratados com DMSO e clofazimina em regime de dose única.....	54
Figura 22 -	Número de plaquetas em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	57
Figura 23 -	Número de plaquetas em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	58
Figura 24 -	TP em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	59
Figura 25 -	TTPA em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	60
Figura 26 -	TP em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	61
Figura 27 -	TTPA em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	62
Figura 28 -	Níveis plasmáticos de AST em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	63
Figura 29 -	Níveis plasmáticos de ALT em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	64
Figura 30 -	Níveis plasmáticos de AST em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	65
Figura 31 -	Níveis plasmáticos de ALT em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	66

Figura 32 -	Níveis plasmáticos de fosfatase alcalina em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	67
Figura 33 -	Níveis plasmáticos de fosfatase alcalina em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	68
Figura 34 -	Níveis plasmáticos de γ -GT em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	69
Figura 35 -	Níveis plasmáticos de γ -GT em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	70
Figura 36 -	Níveis plasmáticos de bilirrubina total em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	71
Figura 37 -	Níveis plasmáticos de bilirrubina direta em ratos tratados com clofazimina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	72
Figura 38 -	Níveis plasmáticos de bilirrubina total em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	73
Figura 39 -	Níveis plasmáticos de bilirrubina direta em ratos tratados com claritromicina em esquema de doses única (A) e múltipla (B).....	74
Figura 40 -	Concentração plasmática em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única.....	76
Figura 41 -	Concentração plasmática em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única.....	79

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Hematopoese	2
1.2 Hemostasia	6
1.3 Função hepática	8
1.4 Fármacos	10
1.4.1 Claritromicina	12
1.4.2 Clofazimina	17
1.4.3 Correlação entre dose e concentração plasmática de fármacos	21
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Material	27
3.1.1 Animais	27
3.1.2 Via de administração	27
3.1.3 Regime de dosagem: dose única - fármacos isolados	28
3.1.4 Regime de dosagem: doses múltiplas – fármacos isolados	29
3.1.5 Coleta de material	29
3.2 Métodos	30
3.2.1 Métodos analíticos	30

3.2.2 Parâmetros hematológicos	30
3.2.3 Parâmetros hemostáticos	32
3.2.4 Parâmetros bioquímicos	32
3.2.5 Análise estatística	34
3.2.6 Fluxograma	35
4. RESULTADOS	36
4.1 Parâmetros hematológicos	37
4.2 Parâmetros hemostáticos	57
4.3 Perfil hepático	63
4.4 Concentrações plasmáticas dos fármacos	75
5. DISCUSSÃO	81
6. CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO	110

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Hematopoese

A produção dos diversos tipos de células do sangue, chamada hematopoese, é um processo complexo, em que um pequeno número de células-tronco expande e diferencia, formando cerca de 10^{11} células por dia. Este processo inclui a auto-regeneração das células-tronco, a restrição da progênie das células-tronco a uma única linhagem celular e a proliferação e diferenciação das células precursoras em células maduras e funcionais (KAUSHANSKY, 2006).

A hematopoese necessita de um microambiente adequado, capaz de sintetizar fatores de crescimento, acomodar as células em desenvolvimento e favorecer as interações entre células de diferentes tipos. Este ambiente é fornecido pelo estroma medular constituído por fibroblastos, adipócitos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais dos capilares sinusóides e também pela matriz extracelular, que constitui o microambiente necessário ao crescimento e diferenciação das células hematopoéticas (ABBOUD; LICHTMAN, 2006). As células precursoras são designadas como unidades formadoras de colônias (CFU) (REGO, 2004). Fatores de transcrição e sinais externos são necessários para a determinação do destino das células enquanto citocinas e moléculas de adesão suportam expansão, diferenciação e sobrevivência das células (KAUSHANSKY, 2006).

Os progenitores e precursores da linhagem eritróide constituem cerca de um terço das células da medula óssea e coletivamente são chamados de *eritron* para reforçar a idéia de que funcionam como um órgão. Os eritrócitos caracterizam-se pela síntese protéica, principalmente hemoglobina, que é necessária ao transporte de oxigênio para os tecidos. Na regulação da eritropoese, a eritropoetina atua na proliferação e maturação das células restritas à linhagem eritróide e sua produção é controlada pelo teor de oxigênio no sangue arterial que irriga as células peritubulares no córtex renal. O progenitor mais precoce da linhagem eritrocítica é a unidade formadora de *burst* eritróide (BFU-E) que requer IL-3, fator

estimulador de colônias granulócito-monócito (GM-CSF) e eritropoetina para proliferação, prevenção da apoptose e diferenciação em precursores. As BFU-E dão origem às unidades formadoras de colônia eritróide (CFU-E), muito sensíveis à eritropoetina, que formam colônias de precursores morfológicamente reconhecíveis (proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático, eritroblasto ortocromático e reticulócito) em 2 a 5 dias (BULL, 2006). Após cerca de 120 dias, há remoção e destruição dos eritrócitos circulantes pelas células do sistema mononuclear fagocitário, especialmente no baço, fígado e medula óssea (DEISS, 1998).

Os leucócitos polimorfonucleares incluem os três tipos de leucócitos: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. São produzidos na medula óssea e vão para os tecidos onde exercem suas funções (ZAGO, 2004a).

Os neutrófilos são granulócitos produzidos a partir de células progenitoras multipotenciais, sob ação de mediadores, especialmente os fatores G-CSF e GM-CSF. A partir do precursor mielóide, passando por fases na medula óssea, há formação de bastonetes e segmentados, que vão para o sangue periférico e em seguida para os tecidos, onde irão exercer seu papel na fagocitose e destruição intracelular de bactérias (ZAGO, 2004a), além de participarem da reação inflamatória aguda (VELDERS; FIBBE, 2005). No sangue periférico, ficam cerca de 8 horas, sendo metade circulante e metade no compartimento marginal, próximo ao endotélio. Fatores como estresse, exercício físico ou liberação de adrenalina fazem com que os neutrófilos marginados circulem, aumentando o número de neutrófilos sem que haja uma liberação significativa de células da medula óssea (COUTINHO; COUTINHO, 2004).

Os eosinófilos são produzidos a partir do precursor mielóide, sob estímulo de GM-CSF, IL-3 e IL-5. Possuem atividade proinflamatória e citotóxica, participando da reação e patogênese de numerosas doenças alérgicas, parasitárias e neoplásicas (ZAGO, 2004a).

Permanecem cerca de 6 a 12 horas em circulação, mas podem sobreviver por até duas semanas quando estimulados por IL-5 e outras citocinas (LOWELL, 2000).

Os basófilos são os polimorfonucleares mais escassos do sangue. A interação de seus receptores de Fc com IgE determina a degranulação com liberação de histamina e calicreína, que são os principais mediadores de reações de hipersensibilidade imediata em anafilaxia, asma e urticária (ZAGO, 2004a).

Os monócitos – macrófagos constituem a primeira linha de defesa do organismo contra parasitas intracelulares, eliminando bactérias e fungos (LOWELL, 2000). O sistema mononuclear fagocitário é composto por um conjunto de células com capacidade fagocitária e lisossomos bem desenvolvidos, adaptados à defesa contra microrganismos, eliminação de restos celulares e tecidos lesados e participação nos mecanismos imunes pela interação com células do sistema linfóide. Os precursores mais imaturos são os monoblastos e promonócitos (ZAGO, 2004b). Estas células são liberadas da medula óssea, transitam pelo sangue periférico por cerca de 4 a 8 horas como monócitos e, em seguida, migram para os tecidos como macrófagos (SUZUKI et al., 2004).

Os linfócitos fazem parte do sistema imune e têm como função principal a defesa do organismo contra infecções. Para o desenvolvimento de linfócitos T e B maduros, são essenciais características do microambiente do timo e da medula óssea, respectivamente, representadas pelo contato com células do estroma e pela ação de citocinas específicas, como IL-4 e IL-7 (FALCÃO; VOLTARELLI, 2004). Os linfócitos B, quando ativados, diferenciam-se em células secretoras de anticorpos. Os linfócitos T são assim subdivididos: células T auxiliares (*helper*), que sob estimulação antigênica secretam citocinas envolvidas na proliferação e diferenciação de células T e B, macrófagos e outros leucócitos; linfócitos T citotóxicos, que destroem células infectadas por vírus e outros microrganismos intracelulares. Há ainda as células *natural killer* (NK), que derivam da mesma célula progenitora e são

capazes de reconhecer e matar células anormais, tais como algumas células tumorais e células infectadas por vírus (JANEWAY et al., 2002; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A secreção de citocinas (interleucinas, fatores de crescimento, interferons e fatores de necrose tumoral) é feita por leucócitos e outros tipos celulares. Elas promovem tanto estimulação como inibição da hematopoese (SOCOLOVSKY et al., 1998).

Nenhuma interleucina, exceto IL-3 e IL-5, induz sozinha a proliferação da célula progenitora. Elas agem em conjunto com outros fatores, como os fatores estimuladores de colônias (CSFs) e fator de célula-tronco (SCF) (VEIBY; MIKHAIL; SNODGRASS, 1997).

A IL-3 estimula a geração e proliferação de macrófagos, neutrófilos, mastócitos, basófilos, megacariócitos e eritrócitos. Associada com M-CSF e IL-1, aumenta a eficiência na produção de macrófagos, enquanto que com o G-CSF, aumenta a eficiência na produção de neutrófilos (ALEXANDER, 1998).

A ação de SCF em conjunto com outras citocinas dá origem a células maduras. Com a eritropoetina, estimula “in vitro” a proliferação de células eritróides, com a IL-7 induz o desenvolvimento de células pré-B e com G-CSF ocorre proliferação de granulócitos (SCHWARZMEIER, 1996).

O GM-CSF está envolvido na regulação da sobrevivência, diferenciação, proliferação e função dos granulócitos e macrófagos, sendo capaz de induzir a geração de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, megacariócitos, precursores eritróides e células dendríticas a partir de progenitores hematopoéticos. Para a diferenciação completa em células maduras requer outros fatores como: eritropoetina para os eritrócitos, G-CSF para neutrófilos, IL-5 para eosinófilos ou trombopoetina para megacariócitos (ALEXANDER, 1998).

O M-CSF estimula a formação de colônias de macrófagos, regulando *in vivo* a produção de fagócitos mononucleares (SUZUKI et al., 2004), enquanto G-CSF aumenta a

produção de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* e controla a resposta neutrofílica ao estímulo inflamatório (DEMETRI; GRIFFIN, 1991).

A trombopoetina (TPO) é um hormônio produzido nos hepatócitos e sinusóides hepáticos e em células do túbulo proximal no rim, cuja função reside na maturação dos megacariócitos, formando os trombócitos ou plaquetas. Atua sinergicamente com outras citocinas, como IL-3, e parece ser um importante regulador de células mais primitivas.

As plaquetas têm importante função na hemostasia (LOURENÇO, 2004) e vivem em média 10 dias na circulação (BAIN, 1998).

1.2 Hemostasia

O sistema hemostático tem a função de interromper sangramentos provenientes de lesão vascular. Para alcançar este objetivo, ocorre uma série de eventos que envolvem vasos sangüíneos, plaquetas, proteínas da coagulação, fibrinólise e anticoagulantes naturais.

As células endoteliais inibem a coagulação sangüínea pela síntese de trombomodulina e heparan sulfato, modulam a fibrinólise pela secreção de plasminogênio, inibem a agregação plaquetária pela liberação de prostaciclina e óxido nítrico e regulam o tônus vascular pela síntese de endotelinas. Quando há lesão vascular, ocorre exposição de colágeno e proteínas subendoteliais. A adesão inicial das plaquetas é mediada pela ligação do fator de Von Willebrand ao complexo Gp Ib/IX/V na superfície plaquetária, resultando em adesão lenta e transitória. A ligação do colágeno a Gp IV favorece a ativação celular, resultando na adesão firme e distribuída através de receptores ativado Gp IIb/IIIa e $\alpha_2\beta_1$. Há sinalização intracelular e ativação plaquetária, que resulta em degranulação das plaquetas com liberação de ADP, geração de tromboxano, ativação do complexo Gp IIb/IIIa e exposição de fosfolípidos aniônicos e geração de microvesículas procoagulantes. Estes facilitam o recrutamento local de plaquetas vizinhas, resultando em agregação mediada pelo fibrinogênio

e fator de Von Willebrand, pela ligação a Gp IIb/IIIa ativada nas células adjacentes. A exposição de fosfolípidos aniônicos propicia uma superfície de contato com plaquetas, mantendo a geração de trombina e formação de fibrina e conseqüente estabilização do tampão hemostático (HARRISON, 2005).

Embora seja tradicional dividir o sistema da coagulação em vias intrínseca e extrínseca, essa divisão não ocorre *in vivo*, pois as vias são integradas, sendo considerada apenas para fins didáticos. A via extrínseca inicia-se pela formação do complexo fator tecidual/fator VIIa, que ativa os fatores IX e X. A via intrínseca ocorre por ativação do fator XI pelo complexo XIIa/cinínogênio de alto peso molecular ativado. O fator XIa, bem como fator tecidual/fator VIIa e fosfolípidos, converte fator IX a IXa. O fator IXa, em conjunto com os fatores VIIIa e fosfolípidos (complexo *tenase*), bem como fator tecidual/fator VIIa e fosfolípidos, converte o fator X a Xa. O complexo protrombinase (fator Va e fosfolípidos) é ativado pelo fator Xa e converte protrombina em trombina, que por sua vez converte fibrinogênio em fibrina, caracterizando a via comum (COLMAN; MARDER; SALZMAN; HIRSH, 1994).

A regulação da coagulação ocorre pela ação dos inibidores naturais presentes no plasma, como: o inibidor C1, que neutraliza o fator XIIa; o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), que bloqueia o fator VIIa/fator tecidual; a antitrombina III, que bloqueia os fatores IXa, Xa e trombina; a proteína C que, ativada pelo complexo trombina/trombomodulina, interage com proteína S e inibe os fatores Va e VIIIa (COLMAN; MARDER; SALZMAN; HIRSH, 1994; ESMON, 2000).

O sistema fibrinolítico ou sistema plasminogênio/plasmina é responsável pela degradação do coágulo de fibrina. A ativação da pró-enzima plasminogênio é feita pelo ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA). A regulação deste sistema se dá pela ação de inibidores dos ativadores de

plasminogênio (PAIs), principalmente o PAI-1, ou por ação direta sobre a plasmina, função esta exercida pela α_2 – antiplasmina (FRANCO, 2004).

Há vários testes laboratoriais que podem ser realizados para avaliar a hemostasia, como determinação dos níveis plasmáticos dos fatores da coagulação, do sistema fibrinolítico e inibidores naturais bem como a avaliação da função plaquetária. Este estudo começa com a avaliação quantitativa e qualitativa das plaquetas. Dentre os testes iniciais, devemos destacar os dois principais testes de *screening*: tempo de protrombina (TP), que avalia as vias extrínseca e comum da coagulação e representa o tempo que o plasma coagula após adição de um fator tecidual, e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), que avalia as vias intrínseca e comum da coagulação, por meio da medida do tempo gasto para a formação do trombo após a adição de ativadores e cálcio ao plasma (MORAN; VIELE, 2005).

1.3 Função hepática

Os testes de função hepática são importantes na triagem de anormalidades, identificação do tipo e local da lesão e também no prognóstico e acompanhamento de pacientes com doença hepática (MOTTA, 2003). São índices que se baseiam em medidas de substâncias liberadas no dano tissular ou análise de substâncias metabolizadas ou produzidas pelo fígado (BALISTRERI; REJ, 1998). Para tanto, é importante o conhecimento das alterações dos níveis plasmáticos ou séricos das enzimas normalmente presentes no compartimento intracelular e que estão presentes na circulação somente em níveis baixos. As alterações na atividade enzimática e de bilirrubinas séricas permitem avaliar a localização e a natureza das alterações patológicas teciduais (MOSS; HENDERSON, 1998). Porém, estes níveis são afetados por fatores como o estado nutricional ou por lesão de outros órgãos (BALISTRERI; REJ, 1998).

A seleção dos testes para fins diagnósticos ou prognósticos depende de vários fatores, entre eles a distribuição das enzimas entre os tecidos (MOSS; HENDERSON, 1998). Os testes bioquímicos de rotina incluem as dosagens de bilirrubinas conjugada e não-conjugada, albumina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, gama-glutamilttransferase (γ -GT) e proteínas totais (MOTTA, 2003).

A bilirrubina sérica apresenta duas frações: a indireta ou não-conjugada, originária da degradação do anel protoporfirínico do grupo heme, que circula ligada à albumina, sendo retirada da circulação pelos hepatócitos; a direta ou conjugada, que é conjugada com o ácido glicurônico nos hepatócitos, para se tornar hidrossolúvel e ser excretada (CHAND; SANYAL, 2007; COSTA, 2004). O aumento de bilirrubina não-conjugada pode ser devido a: produção aumentada desta fração a partir do heme, saída diminuída do plasma para o hepatócito, captação diminuída pela membrana do hepatócito, armazenamento diminuído no citosol ou conjugação reduzida. Já a colestase, aumento de bilirrubina conjugada, ocorre por secreção diminuída nos canalículos ou drenagem reduzida (BALISTRERI; REJ, 1998).

As aminotransferases (AST e ALT) são enzimas intracelulares que catalisam a transferência reversível dos grupos amino de um aminoácido para o α -cetoglutarato, formando cetoácido e ácido glutâmico, atuando na síntese e degradação de aminoácidos. Estão presentes em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. Desta forma, lesão celular hepática promove a liberação destas enzimas para a circulação. ALT é encontrada principalmente no citoplasma, enquanto AST é mitocondrial. Em dano hepatocelular leve a forma sérica predominante é a citoplasmática, já em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial (MOTTA, 2003).

Fosfatase alcalina é amplamente distribuída nos tecidos humanos. A forma predominante na circulação é a de origem hepática e óssea (ZHU; JIANG, 2007). No fígado, localiza-se nas membranas de revestimento dos canalículos biliares, tendo seus níveis

elevados em desordens do trato biliar. Fármacos como a eritromicina podem causar elevações desta enzima no soro (MOTTA, 2003).

A γ -GT exerce importante função no transporte de aminoácidos e peptídios através das membranas, na síntese protéica e na regulação dos níveis de glutatona tecidual. A forma sérica origina-se principalmente dos canalículos hepáticos e células epiteliais que revestem os ductos biliares, sendo importante na avaliação de desordens hepatobiliares. Por estar presente no retículo endoplasmático liso, fármacos podem induzir aumento de sua atividade (MOTTA, 2003).

Medicamentos podem ocasionar lesões hepáticas, uma vez que o fígado atua na biotransformação e eliminação de agentes terapêuticos. Por outro lado, segundo Balistreri e Rej (1998), na disfunção hepática o metabolismo dos fármacos pode ser alterado, sofrendo transformação limitada ou aberrante, acumulando-se no organismo e exercendo efeitos indesejáveis.

A doença hepática também produz alterações na hemostasia pela síntese diminuída dos fatores da coagulação e pela produção de proteínas qualitativamente anormais. O tempo de protrombina (TP) é anormal nos defeitos de coagulação devido a doenças hepáticas porque é afetado pela deficiência de mais de um fator. TP prolongado pode constituir um sinal de grave lesão hepática. Além disso, anticoagulantes endógenos podem estar presentes, o que leva a coagulação intravascular e fibrinólise anormais. Pode haver também alterações quantitativas e funcionais das plaquetas. (BALISTRERI; REJ, 1998).

1.4 Fármacos

Estudos pré-clínicos de toxicidade e segurança são de extrema importância no desenvolvimento de novos fármacos. Segundo Schanaider e Silva (2004), modelos animais são úteis no aprimoramento do conhecimento dos mecanismos patológicos de doenças, no

estudo de marcadores biológicos e na avaliação de novas técnicas visando aplicabilidade na espécie humana. Além disso, para Evans (1997), estes modelos são importantes na avaliação da diferenciação e especialização celular e os resultados são relevantes para o tratamento de doenças hematológicas humanas. Desta forma, é importante a investigação dos efeitos provocados pelos fármacos, por meio de modelos experimentais, já que medicamentos podem interferir no controle da produção de células sanguíneas, a qual é finamente regulada e representa papel relevante nas funções vitais do organismo.

Para se definir um modelo ideal é necessária a aproximação de suas características fisiológicas, anatômicas e orgânicas às do ser humano, através de estudos de anatomia comparada, mas há poucos relatos na literatura referentes a este tipo de estudo. Além disso, é preciso também avaliar os custos para a compra de matrizes compatíveis com a metodologia dos grupos experimentais e para a manutenção dos animais em laboratório (SCHANAIDER; SILVA, 2004).

Variáveis como idade e sexo dos animais interferem nos exames hematológicos e bioquímicos. Ratos jovens possuem tecidos e órgãos imaturos quando comparados aos mais velhos. Diferenças observadas na contagem de eritrócitos e dosagem de hemoglobina podem ser devidas a diferentes demandas de oxigênio de acordo com a idade e o sexo. A contagem global de leucócitos apresenta diferenças que podem estar relacionadas ao desenvolvimento do sistema imune. As variações de atividades das enzimas hepáticas devem-se também a outros fatores, como a dieta. Variações de fosfatase alcalina estão relacionadas inclusive com alto metabolismo ósseo de animais jovens (PETTERINO; ARGENTINO-STORINO, 2006).

Portanto, é importante que as condições ideais ao desenvolvimento dos experimentos sejam padronizadas para que os resultados possam ser adequadamente interpretados e as alterações seguramente referidas ou não à administração dos fármacos estudados.

1.4.1 Claritromicina

Claritromicina é um antibiótico macrolídeo sistêmico semi-sintético (ADACHI; MORIMOTO; KONDOH, 1988). O fármaco difere estruturalmente da eritromicina pela metilação de um grupo hidroxila na posição 6 do anel lactônico (ADACHI; MORIMOTO; KONDOH, 1988; PISCITELLI; DANZIGER; RODVOLD, 1992). A presença de um grupo metil nesta posição minimiza sua degradação em 8,9-anidro-6,9-hemicetal inativo, catalisada por ácido (HARDY; GUAY; JONES, 1992). Foi demonstrado que alguns dos produtos de degradação da eritromicina, como a forma anidroemietônica, aumentam a motilidade do trato gastrointestinal e podem contribuir com os efeitos adversos gastrointestinais deste fármaco (PISCITELLI; DANZIGER; RODVOLD, 1992).

Claritromicina tem propriedade bacteriostática (PISCITELLI; DANZIGER; RODVOLD, 1992) contra organismos altamente suscetíveis, embora possa também ser bactericida em altas concentrações (BENSON; SEGRETI; KESSLER, 1987; MORIMOTO; NAGATE; SUGITA, 1990). Foi observada atividade bactericida contra *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Chlamydia trachomatis* (NEU, 1991).

Em organismos suscetíveis, a claritromicina inibe a síntese de proteínas penetrando a parede celular e ligando-se às subunidades ribossomais 50S, bloqueando a translocação de aminoácidos pelo RNA transportador e interrompendo a síntese de polipeptídeos (PISCITELLI; DANZIGER; RODVOLD, 1992). Não se liga, todavia, aos ribossomos 80S dos mamíferos, o que explica, em parte, sua toxicidade seletiva (KOROLKOVAS, 2004). Seu local de ação parece semelhante ao da eritromicina, clindamicina, lincomicina e cloranfenicol (PISCITELLI; DANZIGER; RODVOLD, 1992).

A atividade da claritromicina *in vitro* é semelhante (BENSON; SEGRETI; KESSLER, 1987) ou superior a de eritromicina contra organismos sensíveis a este último agente (MORIMOTO; NAGATE; SUGITA, 1990). O metabólito principal do fármaco, 14-hidroxiclaritromicina, é tão ativo ou ligeiramente menos ativo que a própria claritromicina

contra a maioria dos organismos e parece aumentar a atividade antimicrobiana do composto original contra patógenos selecionados, como por exemplo, *Haemophilus influenzae*. A atividade de 14-hidroxiclaritromicina contra isolados do complexo *Mycobacterium avium* é 4 a 7 vezes menor do que a do fármaco de origem, sendo desconhecida a importância clínica desta diferença (PISCITELLI; DANZIGER; RODVOLD, 1992).

No estado de equilíbrio, a concentração de 14-hidroxiclaritromicina não aumenta proporcionalmente à dose de claritromicina e, aparentemente, a meia-vida dos dois fármacos tende a ser mais longa com doses maiores. Esse comportamento farmacocinético não-linear da claritromicina, associado com o decréscimo na formação dos produtos 14-hidroxilados e N-dimetilados com doses maiores, indicam que o metabolismo da claritromicina aproxima-se da saturação com altas doses (CHAMBERS, 2003).

Algumas observações *in vitro* indicam que claritromicina é bactericida contra *M. avium* e que esta atividade é potencializada por rifampicina e/ou etambutol (RASTOGI; LABROUSSE, 1991). Porém, cepas de *M. avium* resistentes a claritromicina se desenvolveram durante o tratamento, quando o fármaco foi empregado em monoterapia ou como um componente de politerapia (DE WIT; D'ABRACCIO; DE MOL, 1993). A claritromicina possui ainda atividade bactericida contra o *M. leprae* em pacientes hansenianos (JI et al., 1993). Em monoterapia, é utilizada no tratamento de infecções do trato respiratório. Para a erradicação de *Helicobacter pylori*, é indicada em esquema de politerapia (ÖZSOYLAR; SAYIN; BOLAY, 2007).

A absorção da claritromicina ocorre prontamente no trato gastrointestinal, após administração oral, excedendo a absorção de dose equivalente de eritromicina (NEU, 1991). A biodisponibilidade absoluta de claritromicina, após administração oral de comprimidos de 250 mg, é da ordem de 50 a 55%, que provavelmente é uma subestimação de sua atividade

sistêmica devido à rápida metabolização de primeira passagem do fármaco ao seu metabólito ativo 14-hidroxiclaritromicina (NEU, 1991; PISCITELLI; DANZIGER; RODVOLD, 1992).

Claritromicina e 14-hidroxiclaritromicina parecem ser distribuídas para a maioria dos tecidos e fluidos do corpo. Não há informações referentes à penetração de claritromicina através da barreira hemato-encefálica. A ligação de claritromicina a proteínas plasmáticas *in vitro* varia entre 42 a 72% nas concentrações terapêuticas habituais (PISCITELLI; DANZIGER; RODVOLD, 1992).

Em homens saudáveis, após a administração oral única de comprimidos de 250mg ou 1,2g de claritromicina, calculou-se que a meia-vida de eliminação média é de 4 ou 11 horas, respectivamente (FERRERO; BOPP; MARSH, 1990).

Claritromicina é utilizada no tratamento de infecções disseminadas causadas por *M. avium* e na prevenção destas infecções em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), em estágios avançados desta infecção. De modo geral, o tratamento com claritromicina é bem tolerado. Em estudos clínicos, a maioria dos efeitos adversos foram moderados e passageiros e, apenas em aproximadamente 1% dos casos, os efeitos relatados foram descritos como severos (PISCITELLI; DANZIGER; RODVOLD, 1992).

O complexo do *M. avium* representa dois organismos intimamente relacionados, *M. avium* e *M. intracellulare*. Embora possam ser empregadas técnicas genéticas para distinguir entre as duas espécies, a maioria dos estudos relata resultados referentes a isolados do complexo *M. avium* (ANON, 1992). São organismos amplamente distribuídos no ambiente sendo a água e solo seus reservatórios naturais (THORELL; HUCHZERMEYER; MICHEL, 2001).

M. avium é um importante patógeno que causa doença pulmonar crônica em pacientes imunocompetentes e infecção disseminada em portadores de síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). O tratamento de infecção disseminada por *M. avium* com fármacos

tuberculostáticos mostrou-se insatisfatório, porém a introdução de novos macrolídeos (claritromicina e azitromicina) e de rifabutina melhorou muito os resultados terapêuticos (KATOCH, 2004). Entretanto, estes agentes são associados com reações adversas relacionadas com a terapêutica e potenciais interações medicamentosas. Rifampicinas induzem o citocromo P e aceleram a biotransformação de claritromicina e inibidores de protease. Por outro lado, claritromicina inibe citocromo P450, aumentando a toxicidade de rifabutina. Os resultados globais desta situação são regimes terapêuticos extremamente difíceis de tolerar, especialmente em idosos e pacientes debilitados. Os efeitos adversos são geralmente gastrointestinais. Claritromicina e azitromicina devem ser administrados associados com agentes como etambutol para prevenir surgimento de resistência aos macrolídeos, mas nem todos os pacientes são responsivos a estas combinações. Esta mesma terapia tríplice é também efetiva para infecções disseminadas por *M. avium* em pacientes com SIDA, nos quais o problema adicional da interação rifampicina-inibidor de protease pode estar presente (FIELD; FISHER; COWIE, 2004).

Em estudos clínicos, foram observados diarreia, náusea e alterações no paladar em 3% dos pacientes submetidos a doses orais de claritromicina enquanto dispepsia e desconforto abdominal acometeram 2% dos pacientes. Outros raros efeitos informados incluem candidíase oral, estomatite, vômitos, flatulência, constipação, descoloração da língua, pancreatite e laringismo (PISCITELLI; DANZIGER; RODVOLD, 1992).

Os efeitos adversos mais comuns envolvem o trato digestivo. Com menor frequência, podem ocorrer colestase hepática, erupções cutâneas e ototoxicidade com surdez temporária. Há poucos relatos sobre alterações neurológicas, entre eles um caso de delírio ocasionado por claritromicina utilizada em monoterapia (ÖZSOYLAR; SAYIN; BOLAY, 2007).

A elevação dos níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, lactato desidrogenase (LDH) e/ou bilirrubina total

foi observada em menos de 1% dos pacientes recebendo claritromicina isoladamente ou em terapia combinada com omeprazol. Hepatomegalia e disfunção hepática, incluindo colestase com ou sem icterícia, também foram relatadas em pacientes que receberam o fármaco. A disfunção hepática pode ser severa, mas é aparentemente reversível (CASSELL; DRNEC; WAITES, 1991; POIRIER, 1991).

Em relação às alterações hematológicas e hemostáticas, foi relatado aumento do tempo de protrombina em 1% dos pacientes adultos. Leucopenia foi relatada em cerca de 1% dos pacientes, e trombocitopenia, durante a terapia, em pelo menos um paciente (WALLACE; BROWN; GRIFFITH, 1995). Baz et al. (2004) observaram um caso fatal de anemia aplástica induzida possivelmente pelo uso de claritromicina em uma mulher de 65 anos de idade. Entretanto, Ohe e Kohno (2003) observaram um aumento na contagem de plaquetas de três pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática tratados com claritromicina.

Elevação da concentração plasmática de creatinina foi observada em menos de 1% dos pacientes recebendo o fármaco isolado ou em terapia combinada com omeprazol. Disfunção renal aguda também ocorreu na terapia com claritromicina (WALLACE; BROWN; GRIFFITH, 1995).

Doenças inflamatórias são caracterizadas por acúmulo anormal de células inflamatórias (monócitos, macrófagos, granulócitos, células plasmáticas, linfócitos e plaquetas), que juntamente com células endoteliais e fibroblastos liberam um complexo arranjo de mediadores lipídicos, fatores de crescimento, citocinas e enzimas que causam dano tissular. Este dano é causado principalmente pela ativação de neutrófilos seguido da liberação de proteinases e aumento da produção de espécies de oxigênio (CULIC; ERAKOVIC; PARNHAM, 2001; TAMAOKI; KADOTA; TAKIZAWA, 2004).

Os antibióticos macrolídeos atuam como imunomoduladores em doenças inflamatórias crônicas do trato respiratório através da inibição da produção de várias citocinas inflamatórias

e de efeitos inibitórios sobre o RNA mensageiro de fatores de transcrição destas citocinas. Entre as citocinas inibidas, estão interferon- γ , IL-5 e IL-8. Entretanto, observa-se estimulação da produção de IL-4 (ISHIDA; ABE; HARABUCHI, 2007). Além disso, claritromicina, devido aos seus efeitos antiinflamatórios, bloqueia a formação de moléculas de adesão, necessárias à migração dos neutrófilos para os tecidos (TAMAOKI; KADOTA; TAKIZAWA, 2004).

Khan et al. (1999), em ensaios *in vitro*, observaram a atuação de claritromicina e azitromicina sobre a produção de citocinas por monócitos humanos. Ambos afetaram a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, GM-CSF e TNF- α . Dentre os achados mais importantes, a claritromicina provocou redução significativa de IL-6 e de TNF- α em 60% e 86% dos indivíduos, respectivamente. Com azitromicina, ocorreu redução de IL-1 α e TNF- α , em 100% dos indivíduos.

Os macrolídeos possuem a habilidade de penetração e acúmulo em vários tipos celulares, o que implica em grande importância terapêutica devido a esta propriedade farmacocinética celular favorável, principalmente quando se consideram microrganismos intracelulares facultativos ou obrigatórios (CULIC; ERAKOVIC; PARNHAM, 2001).

1.4.2 Clofazimina

Clofazimina é uma fenazina com atividades antimicobacteriana e antiinflamatória (YAWALKAR; VISCHER, 1979). A clofazimina encontra-se em uso clínico há cerca de 40 anos, porém pouco foi esclarecido sobre seu mecanismo de ação. Esta fenazina, originalmente desenvolvida para o tratamento da tuberculose, é útil em uma série de outras infecções por micobactérias. Com o advento da SIDA, clofazimina adquiriu nova utilidade como componente da multiterapia para o tratamento da infecção oportunista disseminada por *M. avium* (KATOCH, 2004).

Apesar de classificada como fármaco secundário no tratamento da hanseníase e usada como componente de esquemas terapêuticos, sua aplicação tem aumentado principalmente no tratamento de infecções oportunistas em pacientes com SIDA. A molécula apresenta propriedades imunossupressora e antimicobacteriana diretas. Foi demonstrado que clofazimina eleva os níveis de prostaglandinas e a geração de oxidantes reativos nos neutrófilos, o que pode justificar seus efeitos contra o *Mycobacterium leprae*. As defesas da célula hospedeira podem ser estimuladas pela clofazimina, resultando na geração de oxidantes como o ânion-radical superóxido, que por sua vez pode ter um efeito letal sobre o microrganismo (LEMKE, 1995).

O mecanismo de ação da clofazimina contra micobactérias parece envolver a ligação do fármaco com o DNA micobacteriano e inibição de sua replicação e crescimento (KOROLKOVAS, 2004). O fármaco liga-se principalmente a seqüências contendo guanina, o que conduz a uma ligação preferencial ao DNA de micobactérias, uma vez que este contém proporção relativamente maior de guanina e citosina quando comparada ao DNA humano (MORRISON; MARLEY, 1976; YAWALKAR; VISCHER, 1979).

Vários fatores influenciam a atividade dos antibióticos *in vivo*. É importante considerar a susceptibilidade do agente infeccioso, o perfil de concentração do fármaco no soro, em outros fluidos corporais e nos tecidos, e também o sítio de infecção, em relação ao regime de dosagem (BAKKER-WOUDENBERG et al., 2005).

A hanseníase, doença infecto-contagiosa crônica e granulomatosa, transmitida pelo *M. leprae*, ainda se mantém prevalente nos dias atuais, principalmente em países subdesenvolvidos, apesar de todo avanço científico e tecnológico.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza um esquema de poliquimioterapia para o tratamento, que inclui a associação de dapsona, clofazimina e rifampicina, que pode levar à cura em tempo relativamente curto, sendo o tratamento realizado em regime

ambulatorial. Outros protocolos de tratamento têm sido utilizados como, por exemplo, o esquema rifampicina, ofloxacina e minociclina (ROM) (BRASIL, 1999). Prasad et al. (2005) analisaram 44 pacientes hansênicos utilizando esquemas terapêuticos contendo clofazimina e verificaram que a adição deste fármaco ajudou a melhorar os quadros clínico e histológico dos pacientes.

Segundo relatos, clofazimina é bactericida contra *M. leprae in vivo*, porém a avaliação dos efeitos do fármaco é difícil uma vez que *M. leprae* não pode ser cultivado *in vitro*. Clofazimina é bactericida contra *M. tuberculosis* e *M. marinum in vitro*, mas parece ser só bacteriostática *in vitro* contra outras micobactérias, inclusive o complexo *M. avium* (YAWALKAR; VISCHER, 1979). Isolados de *M. avium*, incluindo os obtidos de pacientes com SIDA, geralmente são inibidos *in vitro* por concentrações de clofazimina de 0,1-10 µg/mL (KUZE; KURASAWA; BANDO, 1981).

Clofazimina é incompletamente absorvida no trato gastrointestinal após administração oral. A extensão da absorção oral do fármaco exhibe variações interindividuais consideráveis (SCHAAD-LANYI; DIETERLE; DUBOIS, 1987; YAWALKAR; VISCHER, 1979).

A apresentação dos cristais grosseiros ou micronizados de clofazimina pode ocasionar variações na absorção do fármaco no trato gastrintestinal entre 20% até 45-70% da dose. A relação entre concentrações plasmáticas de clofazimina e os efeitos terapêuticos do fármaco não foi determinada. O fármaco não é distribuído para o cérebro ou líquido céfalo-raquidiano, mas atravessa a placenta e também é distribuído no leite. Quanto à eliminação, a meia-vida tecidual de clofazimina, depois de seguidas doses orais, pode ser de pelo menos 70 dias (YAWALKAR; VISCHER, 1979).

Efeitos adversos gastrointestinais são os principais limitantes da dosagem de clofazimina e acometem a maioria dos pacientes recebendo mais de 100mg/dia de clofazimina e aparentemente são causados por um efeito irritante direto do fármaco sobre a mucosa

intestinal, em um padrão dose-dependente. Os sintomas geralmente diminuem com a redução da dosagem (JOPLING, 1983; YAWALKAR; VISCHER, 1979).

Por ser altamente lipofílica, a clofazimina acumula-se rapidamente no tecido adiposo e células do sistema reticuloendotelial (KOROLKOVAS, 2004). Alguns dos efeitos adversos incluem coloração avermelhada da pele, urina, suor e lágrimas e fotossensibilidade (O'CONNOR; O'SULLIVAN; O'KENNEDY, 1996). Podem ocorrer reações gastrintestinais como náusea, vômito e diarreia devido à deposição de cristais na mucosa intestinal (O'CONNOR; O'SULLIVAN; O'KENNEDY, 1996) e até mesmo quadro abdominal com dor sugerindo obstrução intestinal (KOROLKOVAS, 2004).

Queiroz et al. (2002), em um estudo realizado com 45 pacientes com hanseníase tratados com clofazimina, isolada ou em combinação com dapsona e rifampicina, detectaram a ocorrência de metemoglobinemia e anemia hemolítica somente quando havia associação das drogas. Parâmetros bioquímicos usados para avaliar as funções hepáticas, pancreáticas e renais sofreram alterações ocasionais, sem aparente significado clínico. Goulart et al. (2005) relataram um caso fatal de um paciente com anemia aplástica, associado ao uso da dapsona, rifampicina e clofazimina no tratamento de hanseníase. Segundo relatos da literatura, os efeitos são provavelmente devido ao uso de dapsona.

Atualmente não há nenhuma informação disponível em relação à sobredosagem com clofazimina em humanos. A DL_{50} oral do fármaco é 3,3g/kg em coelhos e superior a 5g/kg em camundongos, ratos e cobaias (YAWALKAR; VISCHER, 1979).

Um regime terapêutico efetivamente superior para o tratamento de infecções por *M. avium* disseminadas em pacientes com SIDA não foi estabelecido. Porém, relatos disponíveis na literatura sugerem que regimes multi-fármacos que contenham um macrolídeo como, por exemplo, claritromicina e azitromicina, são superiores aos que não contêm (FIELD; FISHER; COWIE, 2004). Baral et al. (2006) observaram melhora em gatos imunocomprometidos

tratados com claritromicina associada à clofazimina ou rifampicina e recomendam o uso desta terapia no tratamento de infecções pelo complexo *M. avium*, em gatos.

Quando usada no tratamento de infecções por *M. avium*, recomenda-se para adultos a administração de doses de 100mg de clofazimina uma a três vezes ao dia, associada a outros agentes antimicobacterianos. Doses diárias de 1-2mg/kg têm sido usadas para o tratamento de infecções em crianças, porém doses mais altas de até 50mg/dia ou 4mg/kg diárias, também foram utilizadas (HAWKINS; GOLD; WHIMBEY, 1986).

O tratamento para hanseníase resistente à dapsona e hanseníase multibacilar sensível à dapsona consiste da administração oral de 100mg/dia de clofazimina em adultos, em associação com um ou mais hansenostáticos, durante três anos, seguida de monoterapia com 100mg/dia. Para o tratamento de eritema nodoso lepromatoso, administra-se 100 a 200mg/dia, por até três meses (KOROLKOVAS, 2004).

Um esquema de tratamento que inclui um macrolídeo, claritromicina ou azitromicina, em combinação com etambutol e clofazimina, em pacientes com doença pulmonar pelo complexo *M. avium* apresenta maior facilidade na administração e exige menor monitoramento em relação a outros regimes contendo macrolídeos, além de ser relativamente bem tolerado (FIELD; COWIE, 2003).

1.4.3 Correlação entre dose e concentração plasmática de fármacos

A interação medicamentosa é importante nos esquemas terapêuticos, visto que pode aumentar ou diminuir a eficácia terapêutica, bem como acentuar ou minimizar os efeitos indesejáveis. Podem surgir ainda novos efeitos diferentes daqueles observados nos fármacos utilizados isoladamente ou mesmo não ocorrer nenhuma modificação, apesar de modificações na cinética e no metabolismo de um ou ambos os fármacos (MALFARÁ; UYEMURA; QUEIROZ, 2005).

O envolvimento do sistema enzimático citocromo P450 (CYP3A4) e da glicoproteína P do sistema de transporte na biotransformação de fármacos freqüentemente resulta em interações farmacológicas clinicamente significantes (MALFARÁ; UYEMURA; QUEIROZ, 2005). A claritromicina atua como inibidor dessa isoforma enzimática (GALETIN et al., 2006), e também é responsável pela inibição da glicoproteína P, que corresponde a um transportador de múltiplas drogas, sendo responsável pelo efluxo de fármacos das células (PORRAS et al., 2005).

É importante determinar a relação dose/efeito dos fármacos, visto que há uma variabilidade nesta relação entre pacientes, devido a diferenças na farmacocinética, principalmente na absorção e eliminação, podendo haver também uma pobre aderência do paciente ao regime de dosagem. Devido às variabilidades biológicas interindividuais, é necessária a correlação entre dose administrada e concentração plasmática para que se possa determinar a concentração efetivamente responsável pelos efeitos ou alterações observados, minimizando os riscos de toxicidade (MALFARÁ; UYEMURA; QUEIROZ, 2005).

A avaliação de linfócitos sangüíneos de pacientes hansênicos e tuberculosos tratados revelou a ocorrência de danos ao DNA desses pacientes, em relação àqueles não tratados. Além disso, pacientes com baixa resistência ao *M. leprae* necessitaram de maior dosagem dos antibióticos e tratamento mais prolongado, aumentando assim os danos no seu DNA. Com isso, torna-se importante a determinação dos níveis plasmáticos dos fármacos que determinam os efeitos adversos, visando reduzir estes danos (GANDHI; SINGH, 2004).

Embora os relatos sobre a eficácia sejam satisfatórios, as informações sobre a toxicidade de esquemas de tratamento que incluam clofazimina ou claritromicina são escassas. Assim, neste estudo, nos propusemos a avaliar os possíveis efeitos adversos destas terapias, realizando avaliação de parâmetros hematológicos, hemostáticos e da função hepática, correlação destes parâmetros com a dose dos fármacos bem como correlação da

concentração plasmática com a dose dos fármacos, administrados isolados em ratos Wistar, em regimes de doses única e múltipla.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Determinar as possíveis alterações hematológicas e hemostáticas provocadas pela clofazimina e claritromicina em monoterapia, nos esquemas de doses únicas e múltiplas, administrados a ratos machos Wistar;
- Correlacionar as alterações hematológicas e hemostáticas com as doses dos fármacos isolados;
- Correlacionar as doses e as concentrações plasmáticas dos fármacos isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Foram utilizados 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, distribuídos em 12 grupos. Os animais, durante os experimentos, foram alojados, em número de 5, em caixas de polipropileno medindo 50 x 35 x 15 cm. As caixas foram mantidas em salas com temperatura ambiente constante (22° a 24°C), controlada por meio de aparelho de ar condicionado, em ciclo controlado de 12 horas de claro e escuro. Água e comida foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto – USP, em maio de 2005 (Anexo).

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, esta é uma complicação rara.

Para a determinação do volume injetado em cada animal, foi preparada uma solução na concentração preconizada (50, 100 ou 200mg/kg de peso corpóreo) e então foi injetado “0, peso do animal” da solução (controles e fármacos).

Os fármacos foram administrados seguindo o esquema:

3.1.3 REGIME DE DOSAGEM: dose única – fármacos isolados

3.1.3.1 Controles

- 1: Grupo NaCl (n=30): solução de cloreto de sódio 0,9%.
- 2: Grupo controle do excipiente (DMSO) (n=30): solução de dimetilsulfóxido P.A.

3.1.3.2 Claritromicina (CRT)

- 3: Grupo CRT- 50mg/kg (n=9): solução de 50mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido.
- 4: Grupo CRT- 100mg/kg (n=9): solução de 100mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido.
- 5: Grupo CRT- 200mg/kg (n=7): solução de 200mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido.

3.1.3.3 Clofazimina (CFZ)

- 6: Grupo CFZ 50mg/kg (n=8): solução de 50mg de clofazimina/kg de peso, em dimetilsulfóxido.
- 7: Grupo CFZ 100mg/kg (n=8): solução de 100mg de clofazimina/kg de peso, em dimetilsulfóxido.
- 8: Grupo CFZ 200mg/kg (n=8): solução de 200mg de clofazimina/kg de peso, em dimetilsulfóxido.

3.1.4 REGIME DE DOSAGEM: doses múltiplas – fármacos isolados

Para a realização do regime de doses múltiplas, foi escolhida a dose de 100mg/kg (dose intermediária) para ambos os fármacos após os resultados dos experimentos com as três doses anteriormente estabelecidas.

3.1.4.1 Controles

- 9: Grupo NaCl (n=10): solução de cloreto de sódio 0,9% a cada 24h, durante 4 dias consecutivos.
- 10: Grupo controle do excipiente (DMSO) (n=10): solução de dimetilsulfóxido P.A., a cada 24h, durante 4 dias consecutivos.

3.1.4.2 Clofazimina (CFZ)

- 11: Grupo CFZ 100mg/kg (n=9): solução de 100mg de clofazimina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24h, durante 4 dias consecutivos.

3.1.4.3 Claritromicina (CRT)

- 12: Grupo CRT- 100mg/kg (n=9): solução de 100mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24h, durante 4 dias consecutivos.

3.1.5 Coleta de Material

Amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca que possibilita a coleta de uma quantidade relativamente grande deste material biológico. Foram colhidos aproximadamente 6mL de sangue que foram assim distribuídos: 0,5mL em tubo contendo 5µL de uma solução aquosa de etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA Na₂) a 10%; 1,35mL em tubo cônico graduado contendo 150µL de uma solução aquosa de citrato de sódio dihidratado 3,8g%; 4mL divididos em 2 tubos com 2mL contendo 20µL (20U) de heparina em cada tubo. A

obtenção dos plasmas foi realizada através da centrifugação das amostras heparinizadas e citratadas, a 3000 r.p.m., durante 15 minutos. As amostras de 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 à determinação das concentrações dos fármacos foram armazenadas a -20°C por um período não superior a 15 dias.

Para a realização da coleta de sangue, os ratos foram anestesiados com éter etílico, 2h após a administração dos fármacos, em regime de dose única. Este tempo é baseado na meia-vida dos fármacos analisados. Para o regime de dose múltipla, a coleta foi realizada no quinto dia, ou seja, após 24h da administração da última dose. Os animais foram sacrificados por decapitação logo após a colheita do material.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Métodos Analíticos

A padronização dos métodos de análise da clofazimina e da claritromicina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), bem como as determinações das concentrações plasmáticas (plasma obtido de sangue anticoagulado com heparina), dos fármacos esteve a cargo da prof. Dra. Regina Helena Costa Queiroz, docente das disciplinas de Toxicologia e Análises Toxicológicas desta Faculdade e colaboradora do projeto.

3.2.2 Parâmetros Hematológicos

Amostras de sangue anticoaguladas com EDTA foram utilizadas na determinação dos seguintes parâmetros hematológicos (COATES; MAEDEL, 1995):

- a) Contagem de eritrócitos: 20 μ L de sangue foi diluído em 4,0mL de Líquido de Hayem, em uma proporção 1:200, e uma pequena alíquota da suspensão de células foi examinada ao microscópio óptico, em câmara de Neubauer;
- b) Determinação da concentração de hemoglobina pelo método da cianometaemoglobina;
- c) Hematócrito pelo método do microhematócrito;
- d) Cálculo dos índices eritrocitométricos: os índices Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) foram calculados a partir do conhecimento do número de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e do valor do hematócrito;
- e) Contagem global de leucócitos: 20 μ L de sangue foi diluído em 0,38mL de Líquido de Turk, na proporção de 1:20. Os leucócitos foram contados em microscópio óptico, em câmara de Neubauer;
- f) Fórmula leucocitária: foram contadas 100 células em extensão sangüínea corada com May-Grünwald/Giemsa, em microscopia ótica, e estabelecida a proporção relativa entre os leucócitos; a partir destas proporções foram calculados os números absolutos de cada tipo de leucócito;
- g) Contagem de reticulócitos: quantidades iguais (50 μ L) de sangue e do corante supravital azul cresil brilhante 1% foram incubadas, a 37°C, por 30 minutos. Após este tempo foram confeccionadas extensões sangüíneas, onde foram observados, em microscopia ótica, 10 campos e contados o número de reticulócitos e de eritrócitos. O número de reticulócitos foi expresso em valor absoluto, em função do número total de eritrócitos.

3.2.3 Parâmetros Hemostáticos

- a) Contagem de plaquetas: 20µL de sangue periférico anticoagulado com EDTA foi diluído, na proporção 1:100, em oxalato de amônio a 1%; as contagens foram feitas em câmara de Neubauer, em microscópio óptico;
- b) Tempo de protrombina (TP) determinado, em plasma citratado, pelo método da tromboplastina cálcica anti-heparina - método de Quick (1938), utilizando kit comercial da marca Wiener;
- c) Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) determinado, em plasma citratado, pelo método da cefalina ativada (BELL; ALTON, 1954), utilizando kit comercial da marca Wiener.

3.2.4 Parâmetros bioquímicos

A avaliação do perfil hepático foi realizada por meio da determinação dos seguintes parâmetros bioquímicos:

a) Aspartato aminotransferase (AST): determinada por método cinético otimizado, com reagentes Labtest (Labtest Diagnóstica, MG, Brasil). AST catalisa a transferência do grupamento amina do aspartato para o cetoglutarato, formando glutamato e oxaloacetato, que é reduzido a malato através da malato desidrogenase e NADH é oxidada a NAD^+ . A atividade enzimática de AST é calculada pela redução da absorbância, após conversão de NADH em NAD^+ (REITMAN; FRANKEL, 1957);

b) Alanina aminotransferase (ALT): determinada por método cinético otimizado, com reagentes Labtest (Labtest Diagnóstica, MG, Brasil). É determinada pelo mesmo princípio de AST, substituindo-se o substrato por alanina e a enzima por lactato desidrogenase (REITMAN; FRANKEL, 1957);

c) Fosfatase alcalina: determinada pelo método cinético colorimétrico, utilizando-se reagentes Bayer (Bayer, Produits de diagnostics, France). A fosfatase alcalina hidrolisa o p-nitrofenilfosfato, em meio alcalino, liberando fosfato inorgânico e p-nitrofenol, cuja velocidade de formação determina a atividade catalítica da enzima (BOWERS; McCOMB, 1975);

d) Gama-glutamyltransferase (γ -GT): determinada por método cinético colorimétrico, com a utilização de reagentes Bayer (Bayer, Produits de diagnostics, France). A γ -GT catalisa a transferência do grupamento glutamyl da γ -glutamyl-p-nitroanilida para a glicilglicina, liberando a p-nitroanilina, um produto cromogênico com absorbância em 405-420nm. A quantidade liberada é diretamente proporcional à atividade da enzima (SZASZ, 1969);

e) Bilirrubinas direta e total: determinadas por método colorimétrico, de acordo com Sims e Horn (1958), com reagentes Bayer (Bayer, Produits de diagnostics, France). A bilirrubina reage com o diazo-reagente na presença de um acelerador. Assim é obtida a 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, ou seja, os glicuronídeos de bilirrubina, formando um produto colorido cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de bilirrubina direta.

Todas as determinações foram realizadas utilizando o analisador automático modelo Opera Chemistry Systems da Bayer (Bayer Corporation, Tarrytown, USA), com plasma obtido por sangue anticoagulado com heparina.

3.2.5 Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada com auxílio dos seguintes programas: *GMC*, desenvolvido pelo prof. Dr. Geraldo Maia Campos, do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, utilizado para a realização dos testes de normalidade; *GraphPad Prism®*, utilizando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunns e o teste paramétrico Análise de Variância, seguido do pós-teste de Tukey, que comparam pares de colunas. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

3.2.6 Fluxograma

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros hematológicos

4.1.1 Efeitos da clofazimina sobre o número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito no sangue periférico

A administração de clofazimina provocou aumento do número de eritrócitos na dose de 100mg/kg, em regime de dose única, quando comparada ao controle NaCl 0,9% e à dose de 50mg/kg (Figura 1-A). Em esquema de dose múltipla (Figura 1-B) não foi verificada nenhuma alteração em relação aos controles NaCl 0,9% e DMSO.

Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de hemoglobina e hematócrito, em ambos os esquemas de doses quando comparados aos controles NaCl 0,9% e DMSO (Figuras 2 e 3).

Figura 1. Número de eritrócitos circulantes em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. [□] p<0,01 em relação a NaCl 0,9% e 50mg/kg (A); p>0,05 (B)

Figura 2. Concentração de hemoglobina em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

Figura 3. Valor do hematócrito em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

4.1.2 Efeitos da claritromicina sobre o número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito no sangue periférico

A administração de claritromicina, tanto em dose única (50, 100 e 200mg/kg de peso) como em dose múltipla (100mg/kg de peso), não ocasionou diferença estatisticamente significativa no número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito, quando comparados aos controles NaCl 0,9% e DMSO (Figuras 4, 5 e 6).

A)

B)

Figura 4. Número de eritrócitos circulantes em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

Figura 5. Concentração de hemoglobina em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

Figura 6. Valor do hematócrito em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

4.1.3 Efeitos da clofazimina sobre os índices eritrocitométricos (VCM, HCM e CHCM)

Houve redução estatisticamente significativa no VCM após administração de clofazimina, na dose de 100mg/kg de peso, quando comparado ao grupo controle NaCl 0,9%, no regime de dose única (Figura 7-A). Com relação à dose múltipla, não foram observadas alterações (Figura 7-B).

Não houve variação significativa do HCM em nenhuma das doses utilizadas, tanto em regime de dose única (Figura 8-A) como de dose múltipla (Figura 8-B).

Observou-se uma redução do CHCM na dose de 200mg/kg de peso, embora significância estatística tenha sido verificada apenas quando comparado com a dose de 100mg/kg de peso (Figura 9-A), no regime de dose única. Nenhuma alteração de CHCM foi observada quando se administrou o fármaco em doses múltiplas (Figura 9-B).

Figura 7. VCM em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $\square\square$ $p < 0,001$ em relação a NaCl 0,9% (A); $p > 0,05$ (B)

Figura 8. HCM em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

Figura 9. CHCM em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p < 0,01$ em relação à dose de 100mg/kg (A); $p > 0,05$ (B)

4.1.4 Efeitos da claritromicina sobre os índices eritrocitométricos (VCM, HCM e CHCM)

A administração de claritromicina, tanto em regime de dose única como de dose múltipla, não provocou alteração estatisticamente significativa em nenhum dos índices calculados (Figuras 10, 11 e 12).

Figura 10. VCM em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

Figura 11. HCM em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p>0,05$ (A e B)

Figura 12. CHCM em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p>0,05$ (A e B)

4.1.5 Efeitos da clofazimina sobre o número de leucócitos, células mononucleares e polimorfonucleares do sangue periférico

Não houve alterações estatisticamente significantes no número de leucócitos (Figura 13) e de células mononucleares (Figura 14), quando os ratos foram tratados com clofazimina em regime de doses única e múltipla. Embora sem significância estatística, este fármaco, em todas as doses, provocou uma redução do número de células mononucleares quando comparado aos grupos controles em regime de dose única (Figura 14-A). Esta redução não aconteceu no regime de dose múltipla (Figura 14-B).

A administração de clofazimina, na dose de 200mg/kg de peso, ocasionou aumento estatisticamente significativo no número de células polimorfonucleares, quando comparado a NaCl 0,9%, em regime de dose única (Figura 15-A). Em regime de dose múltipla (Figura 15-B), embora tenha sido observado aumento na dose de 100mg/kg de peso em relação aos controles, este não foi estatisticamente significativo.

Figura 13. Número de leucócitos em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

Figura 14. Número de células mononucleares em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

Figura 15. Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $\square$ $p < 0,05$ em relação a NaCl 0,9% (A); $p > 0,05$ (B)

4.1.6 Efeitos da claritromicina sobre o número de leucócitos, células mononucleares e polimorfonucleares do sangue periférico

Em regime de dose única (Figura 16-A), o número de leucócitos não sofreu alteração quando os animais foram tratados com claritromicina. Entretanto, no regime de dose múltipla, foi observado aumento com significância estatística na dose de 100mg/kg de peso quando comparado aos controles NaCl 0,9% e DMSO (Figura 16-B).

Não houve variações estatisticamente significantes no número de células mononucleares quando os ratos foram tratados em regime de dose única, embora este fármaco tenha provocado uma redução do número destas células em todas as doses (Figura 17-A). Em regime de dose múltipla (Figura 17-B), houve aumento significativo do número de células mononucleares na dose de 100mg/kg de peso, quando comparada aos controles NaCl 0,9% e DMSO.

Houve aumento do número de células polimorfonucleares, na dose única de 100mg/kg, quando comparado ao grupo controle NaCl 0,9% (Figura 18-A). Embora sem significância estatística, o mesmo foi observado na dose de 200mg/kg. Em regime de dose múltipla, ocorreu aumento destas células na dose de 100mg/kg de peso, em relação aos controles NaCl 0,9% e DMSO (Figura 18-B).

Figura 16. Número de leucócitos em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A); $\square\square$ $p < 0,01$ em relação a DMSO e $\square\square\square$ $p < 0,001$ em relação a NaCl 0,9 % (B)

Figura 17. Número de células mononucleares em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A); $\square\square$ $p < 0,01$ em relação a NaCl 0,9% e DMSO (B)

Figura 18. Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. [■] p<0,05 em relação a NaCl 0,9% (A); ^{□□□} p<0,001 em relação a NaCl 0,9% e DMSO (B)

4.1.7 Efeitos da clofazimina sobre o número de reticulócitos no sangue periférico

A administração de clofazimina não ocasionou diferença estatisticamente significante no número de reticulócitos quando comparada aos grupos controles NaCl 0,9% e DMSO, tanto em regime de dose única (Figura 19-A) como de dose múltipla (Figura 19-B).

Figura 19. Número de reticulócitos em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

4.1.8 Efeitos da claritromicina sobre o número de reticulócitos no sangue periférico

A administração de claritromicina, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso, não ocasionou diferença estatisticamente significativa no número de reticulócitos quando comparada aos grupos controles NaCl 0,9% e DMSO, em regime de dose única (Figura 20-A). Também não ocorreram alterações deste parâmetro quando o fármaco foi administrado em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (Figura 20-B).

Figura 20. Número de reticulócitos em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

4.1.9 Efeitos da clofazimina sobre os eritrócitos e células nucleadas no sangue periférico (alterações qualitativas)

As alterações morfológicas nos eritrócitos e nas células nucleadas foram relatadas conforme as condições citadas:

- Condição 1 (C1): normocromia, poiquilocitose e anisocitose discretas
- Condição 2 (C2): normocromia, poiquilocitose e anisocitose moderadas
- Condição 3 (C3): hipocromia discreta, poiquilocitose e anisocitose discretas
- Condição 4 (C4): hipocromia discreta, poiquilocitose e anisocitose moderadas
- Condição 5 (C5): células em degeneração

Tanto nos grupos controles como nos tratados, 10 a 20% dos animais apresentaram alterações morfológicas em suas células (Tabelas 1, 2 e 3). Algumas destas alterações estão ilustradas na figura 21.

Tabela 1: Porcentagem de animais com alterações morfológicas nos eritrócitos do sangue periférico, tratados com clofazimina no esquema de dose única

	NaCl 0,9%	DMSO	CFZ 50	CFZ 100	CFZ 200
	(n=30)	(n=30)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
C1	80	67,9	100	100	62,5
C2	0	10,7	0	0	25
C3	20	21,4	0	0	12,5
C4	0	0	0	0	0

Tabela 2: Porcentagem de animais com alterações morfológicas nos eritrócitos do sangue periférico, tratados com clofazimina no esquema de dose múltipla

	NaCl 0,9%	DMSO	CFZ 100
	(n=10)	(n=10)	(n=9)
C1	100	100	77,8
C2	0	0	22,2
C3	0	0	0
C4	0	0	0

Tabela 3: Porcentagem de animais com alterações morfológicas em células nucleadas do sangue periférico, tratados com clofazimina nos esquemas de doses única e múltipla

	NaCl 0,9%	DMSO	CFZ 50	CFZ 100	CFZ 200
	(n=30, du)	(n=30, du)	(n=8, du)	(n=8, du)	(n=8, du)
	(n=10, dm)	(n=10, dm)		(n=9, dm)	
C5 (du)	16,7	17,9	0	20	60
C5 (dm)	10	30	-	22,2	-

du: dose única; dm: dose múltipla

Figura 21. Extensões sangüíneas coradas de animais tratados com DMSO (A e B) e clofazimina (C e D) em regime de dose única, na dose de 100mg/kg. A) Anisocitose e poiquilocitose. Presença de esquistócito e equinócito (setas 1 e 2, respectivamente); B) Anisocitose e poiquilocitose. Presença de hemácias policromatófilas (setas); C) Leucócito em degeneração; D) Anisocitose e poiquilocitose. Presença de esquistócito, estomatócito e eliptócito (setas 1, 2 e 3, respectivamente)

4.1.10 Efeitos da claritromicina sobre os eritrócitos e células nucleadas no sangue periférico (alterações qualitativas)

As alterações morfológicas nos eritrócitos e nas células nucleadas foram relatadas conforme as condições citadas anteriormente, na página 45.

Dentre os animais dos grupos controles e tratados, 10 a 20% apresentaram alterações morfológicas celulares (Tabelas 4, 5 e 6). Na dose de 200mg/kg (Tabela 4), as alterações parecem ser mais pronunciadas, mas provavelmente estão ligadas ao fato deste grupo apresentar um número menor de animais que os grupos das doses de 50 e 100mg/kg.

Tabela 4: Porcentagem de animais com alterações morfológicas nos eritrócitos do sangue periférico, tratados com claritromicina no esquema de dose única

	NaCl 0,9%	DMSO	CRT 50	CRT 100	CRT 200
	(n=30)	(n=30)	(n=9)	(n=9)	(n=7)
C1	80	67,9	100	66,7	42,8
C2	0	10,7	0	22,2	28,6
C3	20	21,4	0	11,1	0
C4	0	0	0	0	28,6

Tabela 5: Porcentagem de animais com alterações morfológicas nos eritrócitos do sangue periférico, tratados com claritromicina no esquema de dose múltipla

	NaCl 0,9%	DMSO	CRT 100
	(n=10)	(n=10)	(n=9)
C1	100	100	77,8
C2	0	0	11,1
C3	0	0	11,1
C4	0	0	0

Tabela 6: Porcentagem de animais com alterações em células nucleadas do sangue periférico, tratados com claritromicina nos esquemas de doses única e múltipla

	NaCl 0,9%	DMSO	CRT 50	CRT 100	CRT 200
	(n=30, du)	(n=30, du)	(n=9, du)	(n=9, du)	(n=7, du)
	(n=10, dm)	(n=10, dm)		(n=9, dm)	
C5 (du)	16,7	17,9	0	20	71,4
C5 (dm)	10	30	-	40	-

du: dose única; dm: dose múltipla

4.2 Parâmetros hemostáticos

4.2.1 Efeitos da clofazimina sobre o número de plaquetas

Não foram observadas alterações estatisticamente significantes no número de plaquetas em regime de dose única (Figura 22-A) ou múltipla (Figura 22-B), em relação aos controles NaCl 0,9% e DMSO.

Figura 22. Número de plaquetas em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

4.2.2 Efeitos da claritromicina sobre o número de plaquetas

Claritromicina, em regime de doses única (Figura 23-A) e múltipla (Figura 23-B), não provocou alteração estatisticamente significativa no número de plaquetas quando comparada aos grupos controles NaCl 0,9% e DMSO.

Figura 23. Número de plaquetas em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

4.2.3 Efeitos da clofazimina sobre o tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

Após administração de clofazimina ocorreu prolongamento do TP, na dose de 100mg/kg (dose única), em relação ao controle DMSO (Figura 24-A). Não houve diferença estatisticamente significativa no TP em regime de dose múltipla (Figura 24-B) e nem do TTPA em ambos os regimes de dosagem (Figura 25), quando comparados aos controles NaCl 0,9% e DMSO.

Figura 24. Tempo de protrombina em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $\square$ $p < 0,01$ em relação à DMSO (A); $p > 0,05$ (B)

Figura 25. Tempo de tromboplastina parcial ativada em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p>0,05$ (A e B)

4.2.4 Efeitos da claritromicina sobre o tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

Houve um aumento significativo no TP, quando foi administrada claritromicina em dose única de 200mg/kg de peso, quando comparado ao controle DMSO (Figura 26-A). Em regime de dose múltipla (Figura 26-B) também foi observado prolongamento do TP, em relação aos controles NaCl 0,9% e DMSO.

O TTPA não apresentou alterações significativas nos animais tratados com este fármaco, quando comparado com os dois grupos controles, em esquema de dose única (Figura 27-A). Entretanto, na dose múltipla de 100mg/kg, foi observado aumento em relação aos dois controles (Figura 27-B).

Figura 26. Tempo de protrombina em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $\square$ $p < 0,05$ em relação a DMSO (A); $\square$ $p < 0,05$ em relação a NaCl 0,9% e DMSO (B)

Figura 27. Tempo de tromboplastina parcial ativada em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A); $\square$ $p < 0,05$ em relação a DMSO e $\square$ $p < 0,01$ em relação a NaCl 0,9 % (B)

4.3 Perfil hepático

4.3.1 Efeitos da clofazimina sobre os níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)

No regime de dose única, ocorreu aumento nos níveis plasmáticos de AST nos grupos DMSO e 50mg/kg em relação ao grupo controle NaCl 0,9%. Em contrapartida, houve redução destes níveis na dose de 100mg/kg, quando comparada ao controle DMSO e a dose de 50mg/kg (Figura 28-A). No regime de dose múltipla nenhuma alteração foi observada (Figura 28-B).

Figura 28. Níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST) em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $\square$ $p<0,05$ em relação à NaCl 0,9%, $\square$ $p<0,01$ em relação a NaCl 0,9%, $\square$ $p<0,05$ em relação a DMSO e $\square$ $p<0,01$ em relação à dose de 50mg/kg (A); $p>0,05$ (B)

Os níveis plasmáticos de ALT, em esquema de dose única, se elevaram na dose de 50mg/kg em relação ao controle NaCl 0,9% e diminuíram quando clofazimina foi administrada na dose de 200mg/kg de peso, embora esta alteração tenha sido verificada apenas em relação à dose de 50mg/kg de peso (Figura 29-A). Em doses múltiplas, o fármaco não induziu alterações em relação aos grupos controles (Figura 29-B).

Figura 29. Níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT) em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $\square p < 0,05$ em relação a NaCl 0,9% e $\square p < 0,05$ em relação a 50mg/kg (A); $p > 0,05$ (B)

4.3.2 Efeitos da claritromicina sobre os níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)

A administração de claritromicina, tanto em regime de dose única (Figura 30-A) como em regime de dose múltipla (Figura 30-B), não alterou significativamente os níveis plasmáticos de AST, quando comparada aos controles NaCl 0,9% e DMSO. Entretanto, houve redução significativa de ALT, quando claritromicina foi administrada na dose de 100mg/kg de peso, quando comparada ao controle DMSO e dose de 50mg/kg de peso, em regime de dose única (Figura 31-A). Este fármaco também induziu a redução dos níveis plasmáticos de ALT no regime de dose múltipla, tanto em relação à NaCl 0,9% como em relação a DMSO (Figura 31-B).

Figura 30. Níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST) em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

Figura 31. Níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT) em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $\square$ $p < 0,05$ em relação à dose de 50mg/kg (A); $\square$ $p < 0,01$ em relação a NaCl 0,9% e DMSO (B)

4.3.3 Efeitos da clofazimina sobre os níveis plasmáticos de fosfatase alcalina

A administração de clofazimina, em doses única (Figura 32-A) e múltipla (Figura 32-B), não causou alterações com significância estatística nos níveis plasmáticos de fosfatase alcalina quando comparados aos controles NaCl 0,9% e DMSO.

Figura 32. Níveis plasmáticos de fosfatase alcalina em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

4.3.4 Efeitos da claritromicina sobre os níveis plasmáticos de fosfatase alcalina

Foi observado redução dos níveis plasmáticos de fosfatase alcalina em relação ao grupo controle NaCl 0,9%, no esquema de dose múltipla (Figura 33-B). Nenhuma alteração estatisticamente significativa ocorreu em regime de dose única (Figura 33-A), embora tenha sido observada uma redução dos níveis da enzima na medida em que a concentração do fármaco aumenta.

Figura 33. Níveis plasmáticos de fosfatase alcalina em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A); $\square\square\square$ $p < 0,01$ em relação a NaCl 0,9% (B)

4.3.5 Efeitos da clofazimina sobre os níveis plasmáticos de gama-glutamiltransferase (γ -GT)

Observou-se aumento estatisticamente significativo nos níveis plasmáticos de γ -GT, quando clofazimina foi administrada, na dose única de 200mg/kg de peso, em comparação ao controle NaCl 0,9% (Figura 34-A). Porém, estes níveis não se alteraram no esquema de dose múltipla (Figura 34-B).

Figura 34. Níveis plasmáticos de gama-glutamiltransferase (γ -GT) em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $\square$ $p < 0,05$ em relação a NaCl 0,9% (A); $p > 0,05$ (B)

4.3.6 Efeitos da claritromicina sobre os níveis plasmáticos de gama-glutamiltransferase (γ -GT)

Após a administração deste fármaco, houve aumento dos níveis plasmáticos de γ -GT, na dose única de 200mg/kg de peso, em comparação ao controle NaCl 0,9% (Figura 35-A), bem como na dose múltipla de 100mg/kg de peso, em comparação aos controles NaCl 0,9% e DMSO (Figura 35-B).

Figura 35. Níveis plasmáticos de gama-glutamiltransferase (γ -GT) em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $\square$ $p < 0,05$ em relação à NaCl 0,9% (A); $\square$ $p < 0,05$ em relação a DMSO e $\square\square\square$ $p < 0,001$ em relação a NaCl 0,9% (B)

4.3.7 Efeitos da clofazimina sobre os níveis plasmáticos de bilirrubinas total e direta

A administração de clofazimina, em ambos os esquemas de doses, não causou alterações com significância estatística nos níveis plasmáticos de bilirrubinas total e direta quando comparados aos controles NaCl 0,9% e DMSO (Figuras 36 e 37).

Figura 36. Níveis plasmáticos de bilirrubina total em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

Figura 37. Níveis plasmáticos de bilirrubina direta em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $p > 0,05$ (A e B)

4.3.8 Efeitos da claritromicina sobre os níveis plasmáticos de bilirrubinas total e direta

Com relação à claritromicina, foi observado um aumento da concentração plasmática de bilirrubina total, quando administrada na dose de 200mg/kg de peso, em comparação ao controle NaCl 0,9% (Figura 38-A).

Houve aumento da concentração plasmática de bilirrubina direta, quando foi administrada a dose de 200mg/kg de peso, em relação aos controles NaCl 0,9% e DMSO, e em relação às doses de 50mg/kg e 100mg/kg de peso (Figura 39-A).

Não foram observadas alterações com significância estatística no regime de dose múltipla em nenhuma das bilirrubinas (Figuras 38-B e 39-B).

Figura 38. Níveis plasmáticos de bilirrubina total em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $\square$ $p < 0,05$ em relação à NaCl 0,9% e 100mg/kg (A); $p > 0,05$ (B)

Figura 39. Níveis plasmáticos de bilirrubina direta em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso (A) e em regime de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso (B), comparados com os controles NaCl 0,9% e DMSO. As barras representam as medianas. $\square$ $p < 0,05$ em relação à NaCl 0,9% e $\square$ $p < 0,01$ em relação a DMSO, 50mg/kg e 100mg/kg (A); $p > 0,05$ (B)

4.4 Concentrações plasmáticas dos fármacos

4.4.1 Análise da relação entre dose e concentração plasmática de clofazimina

Os resultados relativos às concentrações plasmáticas da clofazimina, correspondentes às doses únicas de 50mg/kg, 100mg/kg e 200mg/kg, estão representados na tabela 7 e figura 40. Embora não existam diferenças estatisticamente significante entre os grupos, foi observada correlação linear positiva (Figura 40).

A tabela 8 mostra os resultados referentes às concentrações plasmáticas de clofazimina (dose de 100mg/kg) no esquema de dose múltipla.

Tabela 7: Concentrações plasmáticas de clofazimina (ng/mL), administrada no esquema de dose única, nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg e 200mg/kg de peso

Nº Animal			
em cada grupo	CFZ 50	CFZ 100	CFZ 200
1	89,60	125,90	122,90
2	44,90	31,10	63,90
3	78,00	119,00	117,50
4	34,50	127,00	66,00
5	117,80	85,00	156,00
6	133,20	89,60	47,50
7	93,40	132,40	103,60
8	98,80	35,00	156,80
Média ± sd	86,28 ± 33,54	93,13 ± 40,95	104,28 ± 41,88

sd = desvio padrão

Figura 40. Concentrações plasmáticas em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso. As barras representam o intervalo: média ± desvio padrão. $p > 0,05$

Tabela 8: Concentrações plasmáticas de clofazimina (ng/mL), administrada no esquema de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso

Animal	CFZ 100
1	130,60
2	136,50
3	118,80
4	123,20
5	122,30
6	120,90
7	114,60
8	137,40
9	121,10
Média ± sd	125,04 ± 7,96

sd = desvio padrão

4.4.2 Análise da relação entre dose e concentração plasmática de claritromicina

Os resultados relativos às concentrações plasmáticas da claritromicina, correspondentes às doses únicas de 50mg/kg, 100mg/kg e 200mg/kg, estão representados na tabela 9 e figura 41. Não foram observadas alterações estatisticamente significantes entre as concentrações plasmáticas, embora tenha sido observado um aumento não linear destes valores com o aumento da dose.

Na tabela 10 estão representados os valores das concentrações plasmáticas de claritromicina, no esquema de dose múltipla (100mg/kg).

Tabela 9: Concentrações plasmáticas de claritromicina ($\mu\text{g/mL}$), administrada no esquema de dose única, nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg e 200mg/kg de peso

Nº Animal em cada grupo	CRT 50	CRT 100	CRT 200
1	2,89	1,34	3,23
2	3,88	5,01	5,63
3	4,73	4,86	9,31
4	4,92	4,35	4,68
5	5,41	3,33	4,96
6	5,22	6,02	6,55
7	3,07	8,74	5,22
8	5,63	7,04	-
9	4,99	6,21	-
Média $\pm$ sd	4,53 $\pm$ 1,01	5,21 $\pm$ 2,15	5,65 $\pm$ 1,90

sd = desvio padrão

Figura 41. Concentrações plasmáticas em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, nas doses de 50, 100 e 200mg/kg de peso. As barras representam o intervalo: média $\pm$ desvio padrão. $p > 0,05$

Tabela 10: Concentrações plasmáticas de claritromicina ($\mu\text{g/mL}$), administrada no esquema de dose múltipla, na dose de 100mg/kg de peso

Animal	CRT 100
1	6,90
2	5,33
3	5,82
4	6,08
5	5,13
6	5,81
7	5,10
8	5,73
9	4,65
Média $\pm$ sd	5,62 $\pm$ 0,66

sd = desvio padrão

5. DISCUSSÃO

A hanseníase, doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, ainda se mantém prevalente nos dias atuais, principalmente em países subdesenvolvidos. A Organização Mundial de Saúde preconiza, para o tratamento, um esquema de poliquimioterapia, em regime ambulatorial que inclui a associação de dapsona, clofazimina e rifampicina (BRASIL, 1999).

A claritromicina possui uma potente atividade bactericida contra o *M. leprae* em pacientes hansenianos, sendo considerada um importante componente para os novos regimes de tratamento de hanseníase (JI et al., 1993).

A clofazimina é bactericida contra *M. leprae in vivo*, mas parece ser só bacteriostática *in vitro* contra micobactérias, inclusive o complexo *Mycobacterium avium* (YAWALKAR; VISCHER, 1979).

Infecção por *M. avium* é uma complicação comum em estágios avançados de infecção por HIV, aumentando os níveis de morbidade e mortalidade. Infecções estabelecidas são tratadas com a combinação claritromicina e etambutol, a menos que o isolado seja resistente a macrolídeos. O tratamento da infecção disseminada é de longo prazo e deve incluir dois agentes antimicrobianos. A associação claritromicina e etambutol é o regime terapêutico padrão, mas alternativas incluem azitromicina, ciprofloxacina, clofazimina e amicacina. Assim, a clofazimina adquiriu nova utilidade como componente de multiterapia para o tratamento da infecção oportunista por *M. avium*. A combinação de claritromicina e clofazimina tem se mostrado eficaz, com boa tolerância dos fármacos (FIELD; COWIE, 2003).

Devido à escassez de relatos referentes à toxicidade destes fármacos, neste estudo foram avaliados os possíveis efeitos adversos destas terapias, através da avaliação de parâmetros hematológicos, hemostáticos e da função hepática e a correlação destes parâmetros com as doses administradas e destas com as concentrações plasmáticas dos

fármacos. Segundo Petterino e Argentino-Storino (2006), valores anormais encontrados em animais sob tratamento podem significar alterações devido a efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos e a avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos é fundamental para a determinação destes efeitos.

5.1 Parâmetros hematológicos

Clofazimina provocou aumento significativo do número de eritrócitos na dose de 100mg/kg, em esquema de dose única (Figura 1-A). Entretanto, os valores de hematócrito não se elevaram na mesma dose, tanto em relação à NaCl 0,9% quanto à dose de 50mg/kg, o que poderia justificar uma hemoconcentração provocada pelo fármaco. Este aumento de eritrócitos pode estar relacionado ao erro na contagem manual destas células, que pode ser de até 20%. Em regime de dose múltipla, os dois parâmetros não sofreram alterações (Figuras 1-B e 3-B) e os resultados dos grupos controles e grupo tratado foram mais homogêneos, o que nos leva a afirmar que a clofazimina não afeta o número de eritrócitos.

Clofazimina ocasionou redução do VCM, na dose única de 100mg/kg (Figura 7-A) e do CHCM, na dose única de 200mg/kg (Figura 9-A), embora esta diferença seja em relação à dose de 100mg/kg. A redução do VCM se deve ao fato de que este índice é resultado de um cálculo numérico que relaciona valor do hematócrito e número de eritrócitos. Como foi observado número elevado de eritrócitos na dose de 100mg/kg (Figura 1-A), conseqüentemente houve redução deste índice. CHCM relaciona concentração de hemoglobina e valor do hematócrito. Houve um aumento do valor do hematócrito, embora sem significância estatística, na dose de 200mg/kg em relação à dose de 100mg/kg (Figura 3-A), que acarretou diminuição do CHCM. No regime de dose múltipla não foram observadas alterações significantes nos índices eritrocitométricos (Figuras 7-B, 8-B e 9-B).

A análise da série leucocitária mostrou que clofazimina, em regime de dose única, provocou redução do número de células mononucleares, em todas as doses, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa (Figura 14-A). Ocorreu aumento significativo do número de células polimorfonucleares quando se utilizou a dose de 200mg/kg (Figura 15-A). Nos ratos controles, o número de células mononucleares é maior do que o das polimorfonucleares. Assim, parece que este fármaco leva a uma inversão da proporção entre células mono e polimorfonucleares, provavelmente devido à mobilização de neutrófilos marginados, visto que o tempo entre a injeção dos fármacos e controles e a coleta foi de apenas duas horas. Embora o número de polimorfonucleares não tenha mostrado diferença significativa entre os grupos controles e tratado, em regime de dose múltipla (Figura 15-B), observa-se uma tendência de aumento destas células o que pode estar relacionado à ação do fármaco, visto que clofazimina estimula a geração de oxidantes como o ânion radical superóxido nos neutrófilos (LEMKE, 1995), o que contribui para a defesa do organismo contra patógenos intracelulares.

Este processo de destruição intracelular de microrganismos ocorre pela aderência do neutrófilo à bactéria, através do processo de opsonização, em que o microrganismo é recoberto por imunoglobulina, complemento ou outros fatores. Ocorre então a fagocitose do patógeno e o conteúdo dos grânulos dos neutrófilos é liberado, destruindo microrganismos pela geração de radicais de oxigênio ou liberação de substâncias independentes da geração de superóxido, como lisozima, lactoferrina, catepsina G e defensina (ZAGO, 2004a).

Claritromicina provocou redução do número de células mononucleares, em todas as doses únicas, embora estes resultados não tenham significância estatística (Figura 17-A). Ocorreu aumento significativo do número de células polimorfonucleares utilizando-se claritromicina na dose de 100mg/kg (Figura 18-A). Do mesmo modo que a clofazimina, claritromicina parece também inverter a proporção entre células mono e polimorfonucleares,

possivelmente pela mobilização do *pool* marginal de neutrófilos causada pelo fármaco, já que esta inversão não foi observada nos grupos controles. Em regime de dose múltipla, claritromicina ocasionou aumento do número de leucócitos (Figura 16-B) e das células mononucleares e polimorfonucleares (Figuras 17-B e 18-B).

Dentre os efeitos adversos observados para eritromicina, um análogo estrutural da claritromicina, está leucocitose e eosinofilia. A biópsia hepática revela infiltração periporta por neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, mas em geral todas as manifestações desaparecem dentro de poucos dias após a suspensão do tratamento (CHAMBERS, 2003).

Citocinas próinflamatórias são importantes mediadores na inflamação e os antibióticos macrolídeos exercem efeitos antiinflamatórios através da inibição da produção destas citocinas por meio de modulação e ativação do fator nuclear kB (NF-kB), que é importante fator de transcrição para genes que codificam citocinas próinflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , e também por inibir a produção de prostaglandina E₂, a atividade quimiotática de neutrófilos e atividade da elastase. Claritromicina modula a proliferação de células T antígeno-específicas e melhora a atividade anti-*M. avium* mediada por IL-12 (ICHIYAMA et al., 2001).

Kikuchi et al. (2002) observaram que o efeito da claritromicina sobre a inibição da produção de IL-8 foi atribuído a concentrações séricas próximas de 10 μ g/mL, em que o fator nuclear kB é inibido. Giamarellos-Bourboulis e colaboradores (2006) verificaram que a melhora de coelhos machos com sepsis foi atribuído à intervenção imunomodulatória de claritromicina nos monócitos, quando administrada via intravenosa, permitindo concentrações maiores do que as convencionais por via oral. Além disso, Ishida, Abe e Harabuchi (2007) verificaram que a produção de IFN- γ foi inibida por este fármaco, em células em cultura, na concentração de 10 μ g/mL.

Os macrolídeos inibem a produção de secreção purulenta, que é causa de maior morbidade e mortalidade de pacientes com inflamação crônica das vias aéreas, por prevenir a liberação de glicoproteínas, reduzir a acumulação dos neutrófilos nas vias aéreas pela inibição da expressão de citocinas proinflamatórias, como IL-1, IL-8 e TNF- α e por promoverem a inibição de moléculas de adesão que permitem o extravasamento de neutrófilos. Assim, os macrolídeos diminuem o número de infecções das vias aéreas não somente por seus efeitos diretos sobre bactérias, mas também por sua habilidade em diminuir a inflamação. A redução de neutrófilos nas vias aéreas dos pacientes também leva a redução da liberação de ânion superóxido, leucotrieno B₄ e defensinas destas células (TAMAOKI; KADOTA; TAKIZAWA, 2004).

Portanto, os efeitos dos medicamentos macrolídeos relacionados à atividade antimicrobiana, somados ao seu envolvimento na produção e liberação de várias citocinas, por seu mecanismo imunomodulatório, podem afetar a regulação da hematopoese, que é mediada por uma gama de citocinas, promovendo alterações na produção e liberação das células sangüíneas, tanto da medula óssea para o sangue periférico como deste para os tecidos, em um padrão dependente da concentração plasmática dos fármacos e do regime de dosagem, o qual determina o tempo de ação do fármaco sobre as células sangüíneas.

A análise das extensões sangüíneas coradas permitiu observar normocromia, anisocitose e poiquilocitose discretas, com presença de dacriócitos, esquistócitos, equinócitos, acantócitos, eliptócitos e estomatócitos, nos animais que integraram os grupos controles e estudo, tanto para clofazimina (Tabela 1) como claritromicina, em regime de dose única (Tabela 4). De 10 a 20% dos animais, dos grupos controles e tratados, apresentaram alterações morfológicas mais pronunciadas nos eritrócitos. Portanto, este grau de alterações parece ser característica comum dos animais examinados e não associada à administração dos fármacos. Foram observadas ainda células em degeneração neste regime de dosagem, sendo que, tanto

para clofazimina (Tabela 3) como para claritromicina (Tabela 6), estas alterações foram mais pronunciadas na dose de 200mg/kg, o que pode estar relacionado à ação dos fármacos sobre a liberação de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos, provocando a morte destas células.

Clofazimina (Tabela 2) e claritromicina (Tabela 5), em regime de dose múltipla, induziram alterações nos eritrócitos circulantes. Da mesma forma, estas diferenças parecem ser características próprias dos animais não associadas ao uso dos fármacos. Com relação às células em degeneração, neste regime de dosagem, a porcentagem de alterações provocadas pela clofazimina (Tabela 3) e pela claritromicina (Tabela 6) foi próxima à do grupo controle DMSO, comportamento semelhante ao regime de dose única na mesma dose (100mg/kg). Como a permanência dos leucócitos na circulação é de poucas horas e há constante remoção destas células, acreditamos que as alterações de degeneração observadas no quinto dia, correspondente à coleta do regime de dose múltipla, revelam apenas as células que entraram em circulação poucas horas antes da coleta.

Foi observado que os animais dos grupos controles do esquema de dose múltipla foram mais homogêneos do ponto-de-vista hematológico do que aqueles que fizeram parte do esquema de dose única. Há variáveis que podem interferir nos resultados dos exames, como variabilidade individual, ambiente, estado de saúde e estresse do animal (Weber et al., 2002). Segundo Schanaider e Silva (2004), isto torna os resultados mais difíceis de serem interpretados. Desta forma, é complexo estabelecer se os efeitos encontrados são devido ao uso dos fármacos ou a vieses do experimento. Neste trabalho, este problema pode ser minimizado através de controles diários que serviram de referência para analisar os resultados obtidos.

Algumas das alterações referentes aos eritrócitos e células em degeneração estão ilustradas na figura 21, que apresenta algumas características morfológicas das células de

animais tratados com DMSO ou clofazimina, em regime de dose única. Embora tenham sido apresentadas extensões sangüíneas coradas destes dois grupos neste regime de dosagem, as mesmas características foram também observadas nas extensões dos demais grupos em ambos os regimes de dosagem, conforme as condições de 1 a 5, apresentadas nas tabelas 1 a 6.

Alguns estudos verificaram diferenças entre os parâmetros hematológicos e/ou bioquímicos ocorridos, possivelmente, devido a diferenças de idade, sexo e/ou linhagem. Entre eles citamos os trabalhos de Owoyele et al. (2004), Goel, Dani e Dhawan (2006), Weber et al. (2002), Teixeira et al. (2000), Vizcaya-Ruiz et al. (2003) e Petterino e Argentino-Storino (2006). Mesmo em estudos com características semelhantes entre os grupos de animais, podem ocorrer variações nos parâmetros medidos em relação aos grupos controles. Neste trabalho, todos os animais eram da mesma linhagem, sexo e idade.

5.2 Parâmetros hemostáticos

Foi observado prolongamento do TP, quando clofazimina foi administrada na dose única de 100mg/kg (Figura 24-A). Em regime de dose múltipla, embora não tenha sido verificada significância estatística, observa-se aumento discreto deste parâmetro em comparação aos controles (Figura 24-B).

Com relação à claritromicina, foram observados prolongamento do TP, tanto em regime de dose única (200mg/kg) como de dose múltipla (Figura 26), e também do TTPA, em regime de dose múltipla (Figura 27-B). Embora sem significância estatística a dose única de 200mg/kg também provocou aumento do TTPA, em comparação aos grupos controles e demais doses (Figura 27-A). Wallace, Brown e Griffith (1995) relataram aumento do TP em 1% de pacientes adultos utilizando claritromicina.

Estas alterações indicam que o uso de doses mais altas destes fármacos podem provocar distúrbios da função hepática. Segundo Balistreri e Rej (1998), a doença hepática

induz modificações na hemostasia devido à síntese reduzida dos fatores da coagulação e pela produção de proteínas qualitativamente anormais.

5.3 Perfil hepático

Foi observado aumento nos níveis plasmáticos de AST, quando foram administrados DMSO e clofazimina na menor dose e redução dos níveis na dose de 100mg/kg, em relação ao controle DMSO e a dose de 50mg/kg, em esquema de dose única (Figura 28-A). A dose de 50mg/kg de peso ocasionou aumento nos níveis de ALT em relação à NaCl 0,9% e a de 200mg/kg causou diminuição dos níveis de ALT, embora esta redução tenha sido em relação à dose de 50mg/kg de peso (Figura 29-A). Em regime de dose múltipla, nenhuma alteração nos níveis destas enzimas foi observada.

Claritromicina alterou os níveis plasmáticos de ALT apenas na dose 100mg/kg de peso, reduzindo seus níveis em relação à dose de 50mg/kg, em regime de dose única (Figura 31-A). Em regime de dose múltipla, foi observada redução dos níveis plasmáticos desta enzima em relação aos controles (Figura 31-B).

Os níveis plasmáticos de fosfatase alcalina diminuíram após administração de claritromicina, no esquema de dose múltipla, em relação ao grupo controle NaCl 0,9% (Figura 33-B). Embora sem significância estatística, observa-se tendência de redução dependente da dose também no esquema de dose única (Figura 33-A).

Os resultados obtidos de AST, ALT e fosfatase alcalina são inconclusivos com relação à indução de dano hepático. Para Schanaider e Silva (2004), há alterações que podem ser resultantes de variáveis interferentes, como estresse, por exemplo, que prejudicam a aferição e interpretação dos resultados.

Observou-se elevação nos níveis plasmáticos de γ -GT quando da administração de clofazimina na maior dose utilizada, em regime de dose única (Figura 34-A).

Claritromicina elevou os níveis plasmáticos de γ -GT tanto quando o fármaco foi administrado na dose única de 200mg/kg (Figura 35-A), como no esquema de dose múltipla (Figura 35-B).

Segundo Motta (2003), γ -GT, por estar presente em grandes quantidades no retículo endoplasmático liso, é susceptível à indução de aumento da sua atividade por fármacos, inclusive os antimicrobianos. De acordo com Wilkinson (2003), a biotransformação dos fármacos ocorre no retículo endoplasmático o que justifica as alterações observadas por nós.

Claritromicina, administrada na dose única de 200mg/kg, provocou aumento tanto dos níveis de bilirrubina total, em comparação ao controle NaCl 0,9% e à dose de 100mg/kg (Figura 38-A), como de bilirrubina direta, em relação aos controles e às outras doses (Figura 39-A). Alguns estudos indicaram aumento de bilirrubina total em cerca de 1% dos pacientes e disfunção hepática, inclusive colestase, em pacientes que receberam este fármaco (CASSELL; DRNEC; WAITES, 1991; POIRIER, 1991). Motta (2003) e Chambers (2003) postulam que a eritromicina, um análogo estrutural da claritromicina, está entre os fármacos envolvidos com a indução de colestase. Nossos resultados confirmam a possibilidade de ocorrer disfunção hepática associada a este fármaco. Balistreri e Rej (1998) afirmam que a colestase, caracterizada pelo aumento de bilirrubina conjugada, acontece por causa da secreção diminuída nos canalículos ou drenagem reduzida.

5.4 Concentrações plasmáticas dos fármacos

A tabela 7 e a figura 40 mostram que houve aumento da concentração plasmática de clofazimina de acordo com o aumento da dose, em regime de dose única, embora não tenha sido verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O gráfico da dose versus concentração plasmática (Figura 40) demonstrou, através do coeficiente de correlação ($R^2=0,9972$), que este aumento apresentou boa correlação linear. O fato de não ter sido

verificada significância estatística pode ser explicado pela variabilidade biológica entre os animais, além de alterações farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Segundo Schaad-Lanyi, Dieterle e Dubois (1987) e Yawalkar e Visser (1979), a extensão da absorção oral de clofazimina exhibe variações interindividuais consideráveis.

Para o esquema de dose múltipla, foi escolhida a dose intermediária de 100mg/kg, visto que houve alterações apreciáveis em vários parâmetros analisados nesta dose, em esquema de dose única. Além disso, houve grande dificuldade de solubilização dos fármacos na dose de 200mg/kg, o que compromete a administração e a absorção dos fármacos, tornando difícil a interpretação dos resultados. Além disso, a escolha de uma única dose para o regime de dose múltipla evita o sacrifício desnecessário de animais, atendendo recomendação feita pelo Comitê de Ética no Uso de Animais.

Os resultados das concentrações plasmáticas de clofazimina referentes ao regime de dose múltipla, apresentados na tabela 8, mostram que houve uma dispersão menor dos dados obtidos em torno da média, ou seja, os resultados foram mais homogêneos em comparação ao regime de dose única. Conforme já mencionado, as variações nas concentrações plasmáticas podem estar associadas à variabilidade individual dos animais e/ou a fatores relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica.

Segundo Bakker-Woudenberg et al. (2005), para que o tratamento com antimicrobianos seja adequado e eficiente, minimizando tanto quanto possível os riscos de toxicidade, é importante considerar, entre outras coisas, o perfil de concentração do fármaco no soro, em outros fluidos corporais e nos tecidos, e também o sítio de infecção, em relação ao regime de dosagem. Kuze, Kurasawa e Bando (1981) observaram que concentrações de clofazimina de 0,1-10µg/mL inibem *in vitro* isolados de *M. avium*. Desta forma, os resultados deste trabalho são importantes visto que há possibilidade de avaliar, a partir da determinação

das concentrações plasmáticas, se concentrações que inibem o crescimento de microrganismos *in vitro* não causam danos ao hospedeiro *in vivo*.

A análise de claritromicina, em regime de dose única, demonstrou aumento da concentração plasmática na medida em que se aumentou a dose (Tabela 9 e Figura 41), embora este aumento não tenha obedecido a uma boa correlação linear ($R^2=0,9052$) e nem tenha havido variação estatística significativa entre os grupos. De acordo com Chambers (2003), a velocidade do metabolismo deste fármaco parece ser saturável e provavelmente é responsável pela farmacocinética não-linear com doses mais altas. Do mesmo modo que clofazimina, alterações na farmacocinética e farmacodinâmica, somadas à variabilidade biológica, podem determinar a ausência de significância estatística entre os grupos tratados com claritromicina.

Para a administração de claritromicina em esquema de dose múltipla (Tabela 10) também foi escolhida a dose intermediária de 100mg/kg, pelos mesmos motivos e limitações referidos em relação à clofazimina. Da mesma forma, os resultados se mostraram mais consistentes quando comparados ao regime de dose única, oscilando pouco em torno da média.

Claritromicina possui a propriedade de inibir o sistema enzimático citocromo P450, responsável pelo metabolismo dos fármacos, e também a glicoproteína P, uma proteína de transporte envolvida na farmacocinética de fármacos. Portanto, quando utilizada em regimes de politerapia, pode ocasionar interações medicamentosas importantes. O conhecimento de concentrações plasmáticas efetivamente responsáveis pelos efeitos terapêuticos e/ou adversos permite estabelecer critérios que direcionem para regimes terapêuticos eficazes e seguros para o paciente. Pesquisadores observaram que o efeito da claritromicina sobre a inibição da produção de IL-8 (KIKUCHI et al., 2002) e IFN- γ (ISHIDA; ABE; HARABUCHI, 2007) foi

atribuído a concentrações séricas próximas de 10µg/mL. Em nosso estudo, foram determinadas concentrações menores, o que poderia interferir no efeito desejado.

6. CONCLUSÕES

6.1 Parâmetros hematológicos

Dose única:

- A clofazimina induziu alterações na série vermelha, aumentando o número de eritrócitos e reduzindo VCM, na dose única de 100mg/kg de peso, e reduzindo CHCM, na dose única de 200mg/kg de peso. Entretanto, estas alterações parecem não ter significado clínico;

- Clofazimina e claritromicina, em todas as doses, levam a uma inversão da proporção entre células mono e polimorfonucleares, reduzindo o número de mononucleares e aumentando o de polimorfonucleares, sendo que os valores destas últimas se elevam significativamente quando os animais são tratados com clofazimina (200mg/kg) e claritromicina (100mg/kg);

- Clofazimina e claritromicina causam aumento do número de células em degeneração, na maior dose.

Dose múltipla:

- Claritromicina provoca aumento de leucócitos e de células mono e polimorfonucleares.

6.2 Parâmetros hemostáticos

Dose única:

- Clofazimina prolonga o TP na dose de 100mg/kg, enquanto claritromicina causa o mesmo efeito apenas na dose de 200mg/kg.

Dose múltipla:

- Claritromicina prolonga o TP e o TTPA.

6.3 Parâmetros bioquímicos

Dose única:

- Clofazimina causa aumento dos níveis plasmáticos de γ -GT na maior dose utilizada e claritromicina, além de ser responsável por este mesmo efeito, ainda eleva os níveis plasmáticos de bilirrubinas total e direta na dose de 200mg/kg de peso.

Dose múltipla:

- Claritromicina provoca aumento dos níveis plasmáticos de γ -GT.

6.4 Concentrações plasmáticas dos fármacos

- Observou-se aumento da concentração plasmática com o aumento da dose, tanto para clofazimina como para claritromicina, embora em doses mais altas o metabolismo da claritromicina seja saturável.

Portanto, observam-se alterações provocadas pela clofazimina e claritromicina tanto em parâmetros hematológicos como hemostáticos e bioquímicos, sendo que as alterações observadas nos dois últimos sugerem que estes fármacos provocam lesão hepática.

Os valores de concentração plasmática serão úteis em estudos posteriores de associação dos fármacos para o estabelecimento de comparações entre as concentrações determinadas em monoterapia e associação e sua correlação com possíveis efeitos adversos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 5th ed., 2005. Cap.1, p. 3-16; Cap.2, p. 17-40; Cap.13, p. 307-326.

ABBOUD, C.N.; LICHTMAN, M.A. Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment. In: LICHTMAN, M.A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, V.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J.T. **Williams-Hematology**. New York: Mc Graw-Hill Medical, 7th ed., 2006. Cap.4, p.35-72.

ADACHI, T.; MORIMOTO, S.; KONDOH, H. 14-Hydroxy -6-O-methylerythromycins A, active metabolites of 6-O-methylerythromycin A in human. **J. Antibiot.**, Tokyo, v.41, p.966-975, 1988.

ALEXANDER, W. S. Cytokines in hematopoiesis. **Int. Rev. Immunol.**, New York, v.16, p.651 – 682, 1998.

ANON. Clarithromycin and azithromycin. **Med. Lett. Drugs Ther.** New York, v.34, p.45-7, 1992.

BAIN, B. J. **Células sanguíneas: consulta rápida**. Porto Alegre: Artmed, 2th ed., 1998.

BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M.; VIANEN, W.V.; SOOLINGEN, D.V.; VERBRUGH, H.A.; AGTMAEL, M.A.V. Antimycobacterial agents differ with respect to their bacteriostatic versus bactericidal activities in relation to time of exposure, mycobacterial growth phase, and their use in combination. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.49, n.6, p.2387-2398, 2005.

BALISTRERI, W.F.; REJ, R. Função hepática. In: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. **Tietz Fundamentos de Química Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4th ed., 1998. Cap.31, p.523-551.

BARAL, R.M.; METCALFE, S.S.; KROCKENBERGER, M.B.; CATT, M.J.; BARRS, V.R.; McWHIRTER, C.; HUTSON, C.A.; WIGNEY, D.I.; MARTIN, P.; CHEN, S.C.A.; MITCHELL, D.H.; MALIK, R.; Disseminated *Mycobacterium avium* infection in young cats: overrepresentation of Abyssinian cats. **J. Feline Med. Surg.**, London, v.8, p.23-44, 2006.

BAZ, K.; IKIZOGLU, G.; YAZICI, A.C.; KOKTURK, A.; TIFTIK, N.; APA, D.D.; DEMIRSERENT, D. Fatal aplastic anaemia in a patient with clarithromycin-induced toxic epidermal necrolysis. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Amsterdam, v.18, p.104-105, 2004.

BELL, W.N.; ALTON, H.G. Brain extract as substitute for platelet suspensions in thromboplastin generation test. **Nature**, London, v.174, p.880-881, 1954.

BENSON, C.; SEGRETI, J.; KESSLER, H. Comparative in vitro activity of A-56268 (TE-031) against gram-positive and gram-negative bacteria and *Chlamydia trachomatis*. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, Wiesbaden, v.6, p.173-178, 1987.

BOWERS Jr., G.N.; McCOMB, R.B. Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.26, p.1988-1995, 1975.

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.

BULL, B. Morphology of erythron. In: LICHTMAN, M.A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J.T. **Williams Hematology**, USA: Mcgraw-Hill Medical, 7th ed., 2006. p.369-385.

CASELL, G.H.; DRNEC, J.; WAITES, K.B. Efficacy of clarithromycin against *Mycoplasma pneumoniae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.27, Suppl A, p.47-59, 1991.

CHAMBERS, H.F. Antimicrobianos. Inibidores da síntese protéica e antibacterianos diversos. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 10th ed., 2003. cap.47, p.929-953.

CHAND, N.; SANYAL, A.J. Sepsis-induced cholestasis. **Hepatology**, Baltimore, v.45, n.1, p.230-241, 2007.

COATES, C.A. Routine testing in Hematology. In: RODAK, B.F. **Diagnostic Hematology**. Philadelphia: Saunders Co, 1995. Cap.12, p.127-143.

COLMAN, R.W.; MARDER, V.J.; SALZMAN, E.W.; HIRSH, J. Plasma coagulation factors. In: COLMAN, R.W.; HIRSH, J.; MARDER, V.J.; SALZMAN, E.W. **Hemostasis and thrombosis**. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994, p. 3-16.

COSTA, F.F. Síndrome hemolítica. Fisiopatologia e clínica. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap. 25, p. 241-248.

COUTINHO, V.; COUTINHO, M.A. Leucocitoses e leucopenias. Alterações morfológicas e funcionais dos leucócitos. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap. 9, p. 87-95.

CULIC, O.; ERAKOVIC, V.; PARNHAM, M.J. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.429, p.209-229, 2001.

DE WIT, S.; D'ABRACCIO, M.; DE MOL, P. Acquired resistance to clarithromycin as combined therapy in *Mycobacterium avium-intracellulare* infection. **Lancet**, London, v.341, p.53-54, 1993.

DEISS, A. Destruição de eritrócitos. In: LEE, G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. **Wintrobe. Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998, v. I, Cap. 8, p. 208-238.

DEMETRI, G. D.; GRIFFIN, J. D. Granulocyte Colony – Stimulating factor and its receptor. **Blood**, New York, v. 78, n.11, p. 2791–2808, 1991.

ESMON, C.T. Regulation of blood coagulation. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1477, p.349-360, 2000.

EVANS, T. Developmental biology of hematopoiesis. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 11, n.6, p. 1115-1147, 1997.

FALCÃO, R.P.; VOLTARELLI, J.C. Ontogênese e diferenciação do tecido linfóide. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap. 6, p. 51-67.

FERRERO, J.L.; BOPP, B.A.; MARSH, K.C. Metabolism and disposition of clarithromycin in man. **Drug. Metab. Dispos.**, Bethesda, v.18, p.441-446, 1990.

FIELD, S.K.; COWIE, R.L. Treatment of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex lung disease with a macrolide, ethambutol, and clofazimine. **Chest.**, Chicago, v.124, p.1482-1486, 2003.

FIELD, S.K.; FISHER, D.; COWIE, R.L. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. **Chest.**, Chicago, v. 126, p. 566-581, 2004.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação do sangue e da fibrinólise. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.740-748.

GALETIN, A.; BURT, H.; GIBBONS, L.; HOUSTON, J.B. Prediction of time-dependent CYP3A4 drug interactions: impact of enzyme degradation, parallel elimination pathways, and intestinal inhibition. **Drug Metab. Dispos.**, Bethesda, v. 34, n.1, p.166-175, 2006.

GANDHI, G.; SINGH, B. DNA damage studies in untreated and treated leprosy patients. **Mutagenesis.**, Oxford, v.19, n.6, p. 483-488, 2004.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J.; ANTONOPOULOU, A.; RAFTOGIANNIS, M.; KOUTOUKAS, P.; TSAGANOS, T.; TZIORTZIOTI, V.; PANAGOU, C.; ADAMIS, T.; GIAMARELOU, H. Clarithromycin is an effective immunomodulator when administered late in experimental pyelonephritis by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Infect. Dis.**, London, v.6, p.31, 2006.

GOEL, A.; DANI, V.; DHAWAN, D.K. Role of zinc in mitigating the toxic effects of chlorpyrifos on hematological alterations and electron microscopic observations in rat blood. **BioMetals.**, Oxford, v.19, p.483-492, 2006.

GOULART, I.M.B.; REIS, A.C.S.; REZENDE, T.M.N.; BORGES, A.S.; FERREIRA, M.S.; NISHIOKA, S.A. Aplastic anaemia associated with multidrug therapy (dapsone, rifampicin and clofazimine) in a patient with lepromatous leprosy. **Lepr. Rev.**, London, v.76, p.167-169, 2005.

HARDY, D.J.; GUAY, D.R.; JONES, R.N. Clarithromycin, a unique macrolide: a pharmacokinetic, microbiological, and clinical overview. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.15, p.39-53, 1992.

HARRISON, P. Platelet function analysis. **Blood Rev.**, Edinburgh, v.19, p.111-123, 2005.

HAWKINS, C.C.; GOLD, J.W.; WHIMBEY, E. *Mycobacterium avium* complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.105, p.184-188, 1986.

ICHIYAMA, T.; NISHIKAWA, M.; YOSHITOMI, T.; HASEGAWA, S.; MATSUBARA, T.; HAYASHI, T.; FURUKAWA, S. Clarithromycin inhibits NF-kB activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, Washington, v.45, p. 44-47, 2001.

ISHIDA, Y.; ABE, Y.; HARABUCHI, Y. Effects of macrolides on antigen presentation and cytokine production by dendritic cells and T lymphocytes. **Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.**, Amsterdam, v.71, p.297-305, 2007.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. O sistema imune na saúde e na doença. **Imunobiologia**. Porto Alegre: Artmed, 5th ed., 2002. Cap.1, p. 21-54.

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.188-190, 1993.

JOPLING, W.H. Side-effects of antileprosy drugs in common use. **Lepr. Rev.**, London, v.54, p.261-270, 1983.

KATOCH, V.M. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). **Indian J. Med. Res.**, New Delhi, v.120, p.290-304, 2004.

KAUSHANSKY, K. Hematopoietic stem cells, progenitors, and cytokines. In: LICHTMAN, M.A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J.T. **Williams Hematology**, New York: Mcgraw-Hill Medical, 7th ed., 2006. p.201-220.

KHAN, A.A.; SLIFER, T.R.; ARAUJO, F.G.; REMINGTON, J.S. Effect of clarithromycin and azithromycin on production of cytokines by human monocytes. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v.11, p.121-132, 1999.

KIKUCHI, T.; HAGIWARA, K.; HONDA, Y.; GOMI, K.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, H.; TOKUE, Y.; WATANABE, A.; NUKIWA, T. Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF-kappa B transcription factors. **J. Antimicrob. Chemoter.**, London, v.49, p.745-755, 2002.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 18.28-18.29; p. 18.80-18.81.

KUZE, F.; KURASAWA, T.; BANDO, K. In vitro and in vivo susceptibility of atypical mycobacteria to various drugs. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v.3, p.885-897, 1981.

LEMKE, T.L. Antimycobacterial Agents. In: FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. **Principles of Medicinal Chemistry**. 4th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1995. p.756-757.

LOURENÇO, D.M. Trombopoese e dinâmica das plaquetas. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap. 7, p. 69-73.

LOWELL, C. Fundamentos da biologia das células sanguíneas. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Imunologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9th ed., 2000. Cap.1, p.7 – 18.

MAEDEL, L.B. Examination of the peripheral blood smear. In: RODAK, B.F. **Diagnostic Hematology**. Philadelphia: Saunders Co, 1995. Cap. 13, p.145-157.

MALFARÁ, W.R.; UYEMURA, S.A.; QUEIROZ, R.H.C. Correlação entre dose/concentração plasmática e avaliação de alterações hepáticas e renais em ratos Wistar tratados com o esquema ROM. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Rio de Janeiro, v.38, n.2, p.167-172, 2005.

MORAN, T.A.; VIELE, C.S. Normal clotting. **Semin. Oncol. Nurs.**, Orlando, v.21, n.4, p.1-11, 2005.

MORIMOTO, S.; NAGATE, T.; SUGITA, K. Chemical modification of erythromycins. III. In vitro and in vivo antibacterial activities of new semisynthetic 6-O-methylethromycins A, TE-031 (clarithromycin) and TE-032. **J. Antibiot.**, Tokyo, v.43, p.295-305, 1990.

MORRISON, N.E.; MARLEY, G.M. The mode of action of clofazimine DNA binding studies. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, Washington, v.44, p.133-134, 1976.

MOSS, D. W.; HENDERSON, A. R. Enzimas. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz Fundamentos de química clínica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4th ed., 1998. Cap. 19, p. 275-325.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o laboratório**. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. Cap.9.3, p.112-113; Cap.9.5, p.117-118; Cap.9.6, p.119-120; Cap.14, p.241-243.

NEU, H.C. The development of macrolides: clarithromycin in perspective. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.27, Suppl A, p.1-9, 1991.

O'CONNOR, R.; O'SULLIVAN, J.F.; O'KENNEDY, R. Determination of serum and tissue levels of phenazines including clofazimine. **J. Chromatogr. B.**, Amsterdam, v.681, p.307-315, 1996.

OHE, M.; KOHNO, M. Three cases of idiopathic thrombocytopenic purpura showing an increase in the platelet count following clarithromycin treatment. **Rinsho Ketsueki.**, Tokyo, v.44, p.1044-1066, 2003.

OWOYELE, B.V.; ALABI, O.T.; ADEBAYO, J.O.; SOLADOYE, A.O.; ABIOYE, A.I.R.; JIMOH, S.A. Haematological evaluation of ethanolic extract of *Allium ascalonicum* in male albino rats. **Fitoterapia.**, Milano, v.75, p.322-326, 2004.

ÖZSOYLAR, G.; SAYIN, A.; BOLAY, H. Clarithromycin monotherapy-induced delirium. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.5, p.1-1, 2007.

PETTERINO, C.; ARGENTINO-STORINO, A. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. **Exp. Toxicol. Pathol.**, Jena, v. 57, p.213-219, 2006.

PISCITELLI, S.C.; DANZIGER, L.H.; RODVOLD, K.A. Clarithromycin and azithromycin: new macrolide antibiotics. **Clin. Pharm.**, Bethesda, v.11, p.137-152, 1992.

POIRIER, R. Comparative study of clarithromycin and roxithromycin in the treatment of community-acquired pneumonia. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.27, Suppl A, p.109-116, 1991.

PORRAS, M.B.; CAMPILLO, M.A.R.; SILVEIRA, E.D.; LHANO, R.J.; DÍAZ, B.G. Intoxicación digitalica secundaria al tratamiento con claritromicina. **Farm. Hosp.**, Madrid, v.29, n.3, p.209-213, 2005.

PRASAD, P.V.S.; BABU, A.; KAVIARASAN, P.K.; VISWANATHAN, P.; TIPPOO REHANA. MDT-MB therapy in paucibacillary leprosy: A clinicopathological assessment. **Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.**, Vellore, v.71, p.242-245, 2005.

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

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

RASTOGI, N.; LABROUSSE, V. Extracellular and intracellular activities of clarithromycin used alone and in association with ethambutol and rifampin against *Mycobacterium avium* complex. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.35, p.462-470, 1991.

REGO, E.M. Hematopoeese, regulação e microambiente. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap. 2, p. 15-22.

REITMAN, S.; FRANKEL, S.A. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic piruvic transaminases. **Am. J. Clin. Path.**, Philadelphia, v.28, p.57-63, 1957.

SCHAAD-LANYI, Z.; DIETERLE, W.; DUBOIS, J.P. Pharmacokinetics of clofazimine in healthy volunteers. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, Washington, v.55, p.9-15, 1987.

SCHANAIDER, A.; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.19, p.441-447, 2004.

SCHWARZMEIER, J. D. The role of cytokines in haematopoiesis. **Eur. J. Haematol**, Copenhagen, v. 57 (Suppl), p. 69-74, 1996.

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.412-417, 1958.

SINGH, S.S. Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs. **Curr. Drug Metab.**, Hilversum, v.7, p.165-182, 2006.

SOCOLOVSKY, M.; CONSTANTINESCU, S.N.; BERGELSON, S.; SIROTKIN, A.; LODISH, H.F. Cytokines in hematopoiesis: specificity and redundancy in receptor function. **Adv. Protein. Chem.**, New York, v.52, p.141-198, 1998.

SUZUKI, H.; KATAYAMA, N.; IKWTA, Y.; MUKAI, K.; FUJIEDA, A.; MITANI, H.; ARAKI, H.; MIYASHITA, H.; HOSHINO, N.; NISHIKAWA, H.; NISHII, K.; MINAMI, N.; SHIKU, H. Activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on monocytes. **Am. J. Hematol.**, New York, v.75, p.179-189, 2004.

SZASZ, G. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.15, p.124-136, 1969.

TAMAOKI, J.; KADOTA, J.; TAKIZAWA, H. Clinical implications of the immunomodulatory effects of macrolides. **Am. J. Med.**, New York, v.117(9A), p.5S-11S, 2004.

TEIXEIRA, M.A.; CHAGURI, L.C.A.G.; CARISSIMI, A.S.; SOUZA, N.L.S.; MORI, C.M.C.; GOMES, V.M.W.G.; POLI NETO, A.; NONOYAMA, K.; MERUSSE, J.L.B. Hematological and biochemical profiles of rats (*Rattus norvegicus*) kept under microenvironmental ventilation system. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.37, n.5, 2000.

THORELL M.F., HUCHZERMEYER H.F., MICHEL A.L. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. **Rev. Sci. Tech.** Paris, v.20, n.1, p. 204-218, 2001.

VEIBY, O.P.; MIKHAIL, A.A.; SNODGRASS, H.R. Growth factors and hematopoietic stem cells. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.11, n.6, p.1173-1184, 1997.

VELDERS, G.A.; FIBBE, W.E. Involvement of proteases in cytokine-induced hematopoietic stem cell mobilization. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 1044, p. 60-69, 2005.

VIZCAYA-RUIZ, A.; RIVERO-MÜLLER, A.; RUIZ-RAMIREZ, L.; HOWARTH, J.A.; DOBROTA, M. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II. **Toxicology**, Amsterdam, v.194, p.103-113, 2003.

WALLACE, R.J.; BROWN, B.A.; GRIFFITH, D.E. Reduced serum levels of clarithromycin in patients treated with multidrug regimens including rifampin or rifabutin for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* infection. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.171, p.747-750, 1995.

WEBER, D.K.; DANIELSON, K.; WRIGHT, S.; FOLEY, J.E. Hematology and serum biochemistry values of dusky-footed wood rat (*Neotoma fuscipes*). **J. Wild. Dis.**, Ames, v.38, p.576-582, 2002.

WILKINSON, G.R. Farmacocinética. Dinâmica da absorção, da distribuição e da eliminação dos fármacos. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 10th ed., 2003. cap.1, p.3-23.

YAWALKAR, S.J.; VISCHER, W. Lamprene (clofazimine) in leprosy. **Lepr. Rev.**, London, v.50, p.135-144, 1979.

ZAGO, M.A. Granulócitos: produção, dinâmica e função. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004a. Cap. 4, p. 33-43.

ZAGO, M.A. Monócitos e macrófagos. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004b. Cap. 5, p. 45-49.

ZHU, X.; JIANG, C. 8-Quinolyl phosphatase as a substrate for the fluorimetric determination of alkaline phosphatase. **Clin. Chim. Acta.**, Amsterdam, v.377, p.150-153, 2007.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 05.1.297.53.0), intitulado: "Alterações Hematológicas e Hemostáticas Induzidas pela Clofazimina e Claritromicina, em Monoterapia e Associação, em Ratos", de autoria de **Flávia Aparecida Paina**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 03.05.05.

Ribeirão Preto, 5 de maio de 2005

Presidente da CEUA
Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior

Secretária da CEUA
Maria Angélica S. Depiro