UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeitos da clofazimina e claritromicina sobre os sistemas hematológico, hemostático e bioquímico de ratos Wistar

Flávia Aparecida Paina

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeitos da clofazimina e claritromicina sobre os sistemas hematológico, hemostático e bioquímico de ratos Wistar

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Flávia Aparecida Paina
Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Souza

Ribeirão Preto
2011

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.

Paina, Flávia Aparecida

Efeitos da clofazimina e claritromicina sobre os sistemas hematológico, hemostático e bioquímico de ratos Wistar. Ribeirão Preto, 2011.

140p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, 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.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Flávia Aparecida Paina
Efeitos da clofazimina e claritromicina sobre os sistemas hematológico, hemostático e bioquímico de ratos Wistar

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora:

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esta tese

Ao meu marido Anderson, por tantos anos de luta juntos, por sua compreensão e apoio mesmo quando eu não podia estar por perto; a distância física nunca afastou o amor, o respeito e o companheirismo. E hoje, temos a certeza de que, para os nossos sonhos, não há barreiras sociais e nem econômicas. E que lutar vale a pena, basta ter fé em Deus e acreditar!

À minha mãe, por me ensinar, com seu exemplo, a ser uma pessoa de bem e de caráter e a nunca desanimar diante das adversidades; pelo apoio incansável a mim e ao Anderson!

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 na realização da determinação das concentrações plasmáticas dos fármacos e pelas orientações fundamentais sobre esta metodologia.

Ao professor Marcelo Dias Baruffi e à professora Luciana Simon Pereira Crott, pela disponibilização de seus laboratórios, equipamentos e reagentes.

À professora Ana Lúcia da Costa Darini, por ceder gentilmente as bactérias *E. coli* cepa DH 10B.

Às funcionárias Zita, Zelma, Solange e Jennifer, pela colaboração na realização do projeto e Sônia Dreossi, pela realização das dosagens das concentrações plasmáticas dos fármacos.

À funcionária Fabiana, da Citometria de Fluxo, pela realização dos ensaios de função de neutrófilos

Às funcionárias Cristina e Jose, do laboratório de Microbiologia, pelo preparo da suspensão de bactérias *E. coli*

À funcionária Eleni, do Laboratório de Análises Clínicas, pela realização das dosagens dos parâmetros hemostáticos

Aos funcionários Ronaldo, Antônio, Reinaldo e Ramon, do biotério da FCFRP, pela boa vontade e atenção no fornecimento e cuidados com os ratos.

Às amigas Lorena e Jennifer, pelo apoio e força constantes, pela valiosa ajuda nos trabalhos acadêmicos, pela amizade, companheirismo e apoio.
Aos colegas do laboratório de Hematologia Clínica: Cristiane, Julise, Elainy, Ieda, Raquel e Jaqueline, pela convivência agradável e amizade.

À minha amiga Rose, pela disponibilização de vários artigos científicos e pela amizade.

Aos colegas do laboratório de Glicoimunobiologia: Thalita, Karina, Willian, Camilo, Lílian, Nathália e Bianca, pelos momentos de descontração, fundamentais pra deixar a vida mais leve.

Aos amigos da comissão organizadora do III SINPOSPq, pela experiência enriquecedora e marcante e pelo privilégio da convivência e do valioso aprendizado acadêmico e pessoal.

À Renata, diretora do curso de Farmácia da Universidade de Uberaba, e à Adriana, assistente pedagógica da mesma universidade, pela compreensão e apoio no término do curso de Doutorado e no início da minha vida profissional 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 Doutorado.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de Doutorado.

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

"Eu não me envergonho de corrigir meus erros nem de mudar minhas opiniões. Porque não me envergonho de raciocinar e aprender" - Alexandre Herculano

RESUMO

PAINA, F.A. **Efeitos da clofazimina e claritromicina sobre os sistemas hematológico, hemostático e bioquímico de ratos Wistar**. 2011. 140f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Claritromicina e clofazimina são utilizadas no tratamento da hanseníase e em infecções causadas pelo complexo *Mycobacterium avium*, comuns em portadores do HIV. Devido à escassez de dados sobre a toxicidade de esquemas terapêuticos que associam estes fármacos, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos adversos desta terapia, em ratos machos Wistar, por meio da determinação de parâmetros hematológicos, hemostáticos e bioquímicos e correlação destes parâmetros com a dose e concentração plasmática dos medicamentos, em regime de doses únicas e múltiplas. Para tanto foram realizados: a) contagem global e específica de leucócitos (método manual) e ensaios de fagocitose e *burst* oxidativo de neutrófilos (citometria de fluxo); b) contagem de plaquetas (método manual), tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, níveis plasmáticos dos fatores VII e X (método automatizado); c) níveis séricos de gama-glutamiltransferase (método cinético-colorimétrico) e bilirrubinas total e direta (método colorimétrico); d) concentrações plasmáticas dos fármacos (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Não houve diferenças entre as concentrações plasmáticas dos fármacos administrados em monoterapia ou politerapia. Entretanto, tanto clofazimina como claritromicina tiveram redução das concentrações plasmáticas em regime de doses múltiplas, quando comparadas à dose única. Houve aumento do número de leucócitos (dose múltipla) e de células polimorfonucleares (doses única e múltipla) nos grupos tratados com claritromicina em monoterapia ou associada à clofazimina, e redução das células mononucleares, em doses única e múltipla, nos mesmos grupos. Os fármacos parecem inverter a proporção entre células mono e polimorfonucleares. Observou-se aumento do *burst* oxidativo nos animais tratados com os fármacos tanto em monoterapia como em regime de politerapia. Entretanto, não houve diferença entre os tratamentos com os fármacos em relação ao controle DMSO, em dose única. Em doses múltiplas, os tratamentos com clofazimina e claritromicina em monoterapia ou politerapia estimularam o aumento do *burst* oxidativo ($p < 0,0001$) em relação ao controle DMSO. Não foram verificadas diferenças na fagocitose entre os grupos tratados e controle, tanto em dose única como em doses múltiplas. Tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada não foram alterados com o uso dos fármacos. Os fatores VII e X da coagulação tiveram aumento de suas atividades quando os ratos foram tratados em regime de dose múltipla com claritromicina, em regime de mono e politerapia. Houve perda de cerca de 8 % do peso de ratos tratados com clofazimina e 18 % daqueles tratados com claritromicina ou com a associação dos dois fármacos, no esquema de doses múltiplas, entretanto não houve diferença entre os grupos quando foram avaliados os níveis de gama-glutamiltransferase e bilirrubinas total e direta. Concluindo, 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 politerapia entre os medicamentos.

Palavras-chave: clofazimina, claritromicina, leucócitos, fagocitose, *burst* oxidativo, alterações hemostáticas.

ABSTRACT

PAINA, F.A. C**lofazimine and clarithromycin effects on the hematological, hemostatic and biochemical systems of Wistar rats.** 2011. 140f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Clarithromycin and clofazimine have been used to treat leprosy and infections caused by *Mycobacterium avium* complex in HIV patients. Because there are few data about the toxicity of treatment regimens involving these drugs, this study aimed to evaluate the adverse effects of this therapy in male Wistar rats through the determination of hematological, haemostatic and biochemical parameters and correlate them with the dose and plasma concentrations of drugs, under a single and multiple dose regimen. Evaluation was performed as follows: a) Global and specific count of leukocytes (manual method), phagocytosis and oxidative burst of neutrophils assays (flow cytometry), b) platelet count (manual method), prothrombin time, activated partial thromboplastin time, plasma levels of factors VII and X (automated method), c) Gamma-glutamyltransferase (kinetic-colorimetric method) and total and direct bilirubin serum levels (colorimetric method), d) plasma concentrations of drugs (High-Performance Liquid Chromatography). There were no differences between plasma concentrations of the drugs administered in monotherapy or polytherapy. However, the concentrations of both clofazimine and clarithromycin have decreased in plasma in multiple dose regimen compared to single dose. There was an increase in the number of leukocytes (multiple dose) and polymorphonuclear cells (single and multiple doses) in the groups treated with clarithromycin in monotherapy or in association with clofazimine, and a decrease in the number of mononuclear cells in single and multiple doses, in the same groups. Both drugs seemed to reverse the proportion between mononuclear and polymorphonuclear cells. The oxidative burst was observed in animals treated with drugs in polytherapy or in monotherapy, however there was no difference between the treatment with drugs and the control with DMSO in single dose. In multiple doses, treatment with clofazimine and clarithromycin in monotherapy or polytherapy stimulated the increase of oxidative burst ($p < 0.0001$) compared to control. There were no differences in phagocytosis between the treated and control groups in single and multiple doses. Prothrombin time and activated partial thromboplastin time have not changed with the use drugs. In contrast, the activities of factors VII and X of coagulation have increased when rats were treated with multiple doses regimes with clarithromycin alone or in association with clofazimine. There was weight loss of 8% in rats treated with clofazimine and 18% in those treated with clarithromycin or with association of the drugs in the multiple doses regimen. However, there was no difference between the groups when gamma-glutamyltransferase and total and direct bilirubin levels were analyzed. Therefore, clofazimine and clarithromycin induce hematological, hemostatic and biochemical changes and the results of plasma concentration is valuable for assessing adverse effects in comparative studies of monotherapy and polytherapy of these drugs.

Keywords: clofazimine, clarithromycin, leukocytes, phagocytosis, oxidative burst, hemostatic abnormalities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de ativação dos neutrófilos 07
Figura 2. Complexo NADPH oxidase..... 09
Figura 3. O papel das plaquetas na hemostasia 11
Figura 4. Vias da coagulação para a geração de trombina e fibrina 12
Figura 5. Formação do coágulo de fibrina no local da lesão vascular 12
Figura 6. Estrutura química da claritromicina 16
Figura 7. Estrutura química da clofazimina..... 21
Figura 8. Piloto das concentrações plasmáticas dos fármacos..... 34
Figura 9. Fluxogramas dos pilotos dos anestésicos 37
Figura 10. Fluxograma geral da metodologia 38
Figura 11. Número de leucócitos em ratos tratados com DMSO e clofazimina em regime de dose única – piloto de anestésicos com ratos do Biotério Central..... 47
Figura 12. Número de leucócitos em ratos tratados com DMSO e claritromicina em regime de dose única – piloto de anestésicos com ratos do Biotério Central 48
Figura 13. Número de células mononucleares em ratos tratados com DMSO e clofazimina em regime de dose única – piloto de anestésicos com ratos do Biotério Central 48
Figura 14. Número de células mononucleares em ratos tratados com DMSO e claritromicina em regime de dose única – piloto de anestésicos com ratos do Biotério Central 49
Figura 15. Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com DMSO e clofazimina em regime de dose única – piloto de anestésicos com ratos do Biotério Central 49
Figura 16. Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com DMSO e claritromicina, em regime de dose única – piloto de anestésicos com ratos do Biotério Central 50
Figura 17. Número de leucócitos em ratos tratados com DMSO e clofazimina em regime de dose única – piloto de anestésicos com ratos SPF..... 50

Figura 18. Número de leucócitos em ratos tratados com DMSO e claritromicina em regime de dose única – piloto de anestésicos com ratos SPF 51
Figura 19. Número de células mononucleares em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única – piloto de anestésicos com ratos SPF 51
Figura 20. Número de células mononucleares em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única – piloto de anestésicos com ratos SPF 52
Figura 21. Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única – piloto de anestésicos com ratos SPF 52
Figura 22. Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única – piloto de anestésicos com ratos SPF 53
Figura 23. Médias dos pesos de ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a associação dos fármacos em regime de dose múltipla 59
Figura 24. Concentrações plasmáticas de claritromicina em monoterapia ou politerapia com clofazimina, em ratos tratados em regime de dose única 60
Figura 25. Concentrações plasmáticas de claritromicina em monoterapia ou politerapia com clofazimina, em ratos tratados em regime de dose múltipla 61
Figura 26. Concentrações plasmáticas de claritromicina em monoterapia ou politerapia com clofazimina, em ratos tratados em regime de doses única e múltipla 62
Figura 27. Concentrações plasmáticas de clofazimina em monoterapia ou politerapia com claritromicina, em ratos tratados em regime de dose única 64
Figura 28. Concentrações plasmáticas de clofazimina em monoterapia ou politerapia com claritromicina, em ratos tratados em regime de dose múltipla 65

Figura 29. Concentrações plasmáticas de clofazimina em monoterapia ou politerapia com claritromicina, em ratos tratados em regime de doses única e múltipla 66
Figura 30. Número de leucócitos em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única e múltipla 67
Figura 31. Número de células mononucleares em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única e múltipla 68
Figura 32. Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única e múltipla 68
Figura 33. Esquema representativo de gráfico *dot-plot* obtido por citometria de fluxo em amostra de sangue de ratos 70
Figura 34. *Burst* oxidativo de neutrófilos de ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única e múltipla 70
Figura 35. Porcentagem de neutrófilos positivos para o *burst* oxidativo de ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única e múltipla 72
Figura 36. Média da intensidade de fluorescência produzida na fagocitose pelos neutrófilos de ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única e múltipla 73
Figura 37. Porcentagem de neutrófilos fagocíticos de ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única e múltipla 73
Figura 38. Número de plaquetas em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única e múltipla 74
Figura 39. Tempo de protrombina em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única e múltipla 75

Figura 40. Tempo de tromboplastina parcial ativada em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única e múltipla 75
Figura 41. Atividade do fator VII da coagulação em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única e múltipla 77
Figura 42. Atividade do fator X da coagulação em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única e múltipla 77
Figura 43. Níveis plasmáticos de gama-glutamiltransferase (γ-GT) em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única e múltipla 78
Figura 44. Níveis plasmáticos de bilirrubina total em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única e múltipla 79
Figura 45. Níveis plasmáticos de bilirrubina direta em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única e múltipla 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pesos de ratos tratados com dimetilsulfóxido, clofazimina, claritromicina e com a politerapia, no primeiro dia do esquema de dose múltipla 54
Tabela 2 - Pesos de ratos tratados com dimetilsulfóxido, clofazimina, claritromicina e com politerapia, no segundo dia do esquema de dose múltipla 55
Tabela 3 - Pesos de ratos tratados com dimetilsulfóxido, clofazimina, claritromicina e com a politerapia, no terceiro dia do esquema de dose múltipla 56
Tabela 4 - Pesos de ratos tratados com dimetilsulfóxido, clofazimina, claritromicina e com a politerapia, no quarto dia do esquema de dose múltipla 57
Tabela 5 - Pesos de ratos tratados com dimetilsulfóxido, clofazimina, claritromicina e com a politerapia, no quinto dia do esquema de dose múltipla 58
Tabela 6 - Concentrações plasmáticas de claritromicina (µg/mL), administrada no esquema de dose única, em monoterapia ou politerapia com clofazimina 60
Tabela 7 - Concentrações plasmáticas de claritromicina (µg/mL), administrada no esquema de dose múltipla, em monoterapia ou politerapia com clofazimina 61
Tabela 8 - Concentrações plasmáticas de clofazimina (ng/mL), administrada no esquema de dose única, em monoterapia ou politerapia com claritromicina 63
Tabela 9 - Concentrações plasmáticas de clofazimina (ng/mL), administrada no esquema de dose múltipla, em monoterapia ou politerapia com claritromicina..... 64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	*Adenosine diphosphate* (Adenosina difosfato)
ALT	*Alanine aminotranspherase* (Alanina aminotransferase)
AST	*Aspartate aminotranspherase* (Aspartato aminotransferase)
BFU-E	*Erythroid burst-forming units* (Unidades formadoras de *burst* eritróide)
CFU-E	*Erythroid colony-forming units* (Unidades formadoras de colônia eritróide)
CFZ	Clofazimina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CRT	Claritromicina
CSF	Fator estimulador de colônia
CYP	Citocromo P450
DGC	Doença granulomatosa crônica
DHR	Dihidrorodamina
DL	Dose letal
dm	Dose múltipla
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	*Desoxiribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucléico)
du	Dose única
EDTA Na_2	Etilenodiaminotetracetato dissódico
EGF	*Epidermal growth factor* (Fator de crescimento epidermal)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	*Fluorescein isothiocyanate* (Isotiocianato de fluoresceína)
fMLP	*N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine* (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina)

G-CSF	*Granulocyte-colony stimulating factor* (Fator estimulador de colônias granulocítico)
GM-CSF	*Granulocyte monocyte colony stimulating factor* (Fator estimulador de colônias granulócito-monócito)
Gp	Glicoproteína
HIV	*Human immunodeficiency virus* (Vírus da imunodeficiência humana)
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	*Low-density lipoprotein* (Lipoproteína de baixa densidade)
LPS	Lipopolissacarídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase
NK	*Natural killer*
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI	*Plasminogen activator inhibitor* (Inibidor dos ativadores de plasminogênio)
PBS	*Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato/salina)
phox	*Phagocyte oxidase* (Oxidase do fagócito)
PI	*Propidium iodide* (Iodeto de propídeo)
PMA	*Phorbol myristate acetate* (Acetato miristato de forbol)
PMNs	Polimorfonucleares
RNA	*Ribonucleic acid* (Ácido ribonucléico)
ROM	Rifampicina, ofloxacina e minociclina
sd	*Standard deviation* (Desvio padrão)
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida

SMF	Sistema mononuclear fagocitário
SPF	*Specific pathogen free* (Livre de patógenos específicos)
TFPI	*Tissue factor pathway inhibitor* (Inibidor da via do fator tecidual)
TP	Tempo de protrombina
t-PA	*Tissue plasminogen activator* (Ativador de plasminogênio do tipo tecidual)
TPO	Trombopoetina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
u-PA	*Urokinase plasminogen activator* (Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase)
γ–GT	Gama-glutamiltransferase

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract Ii
Lista de figuras Iii
Lista de tabelas Vii
Lista de abreviaturas e siglas viii

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Hematopoese 2
1.1.1 Função efetora dos neutrófilos 5
1.2 Hemostasia 10
1.3 Função hepática 14
1.4 Fármacos 15
1.4.1 Claritromicina 16
1.4.2 Clofazimina 21
1.4.3 Uso dos fármacos em associação 24

2. OBJETIVOS 27

3. MATERIAL E MÉTODOS 29
3.1 Material 30
3.1.1 Animais 30
3.1.2 Via de administração 30
3.1.3 Esquemas de dosagem de clofazimina e claritromicina 30
3.1.4 Estabelecimento das doses a partir dos pesos dos animais 33
3.1.5 Colheita do material 35
3.1.6 Ensaio piloto de anestésicos 35
3.2 Métodos 38
3.2.1 Métodos analíticos 39
3.2.2 Parâmetros hematológicos 39
3.2.3 Parâmetros hemostáticos 42
3.2.4 Parâmetros bioquímicos 43
3.2.5 Análise estatística 44

4. RESULTADOS 45
4.1 Pilotos 46
4.1.1 Concentração plasmática dos fármacos: estabelecimento do regime de doses múltiplas 46
4.1.2 Ensaio piloto de anestésicos 46
4.2 Experimentos 53
4.2.1 Variação de peso dos animais em regime de dose múltipla 53
4.2.2 Concentração plasmática dos fármacos 59
4.2.3 Parâmetros hematológicos 66
4.2.4 Parâmetros hemostáticos 74
4.2.5 Parâmetros bioquímicos 78

5. DISCUSSÃO 80

6. CONCLUSÕES 103

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 106

ANEXO 119

1. INTRODUÇÃO

Estudos sobre efeitos adversos causados por fármacos, utilizando modelos experimentais, são importantes, pois permitem avaliar diferenciação e especialização celular, o que é fundamental para o direcionamento da melhor forma de tratamento das doenças hematológicas humanas (EVANS, 1997). Schanaider e Silva (2004) reforçam essa idéia, postulando que modelos animais são úteis no aprimoramento do conhecimento de mecanismos patológicos de doenças, e ainda acrescentam a importância da utilização de animais no estudo de marcadores biológicos e na avaliação de novas técnicas aplicáveis à espécie humana.

Para se definir o modelo ideal é necessária a aproximação de suas características fisiológicas, anatômicas e orgânicas com as dos seres humanos, através de estudos de anatomia comparada, entretanto há poucos relatos na literatura referentes a estes estudos. Além disso, é preciso avaliar os custos da compra de matrizes compatíveis com a metodologia dos grupos experimentais e da manutenção dos animais em laboratório (SCHANAIDER; SILVA, 2004).

A investigação de efeitos adversos provocados por fármacos pode ser realizada utilizando-se parâmetros previamente estabelecidos que permitam avaliar as alterações que estejam ocorrendo no organismo, decorrentes do uso dos medicamentos. Os resultados são importantes para estabelecer critérios que direcionem a forma correta de tratamento e os regimes terapêuticos mais eficazes e seguros para o paciente, minimizando os efeitos indesejáveis.

1.1 Hematopoese

A produção das células sanguíneas, chamada hematopoese, ocorre através da expansão e diferenciação de um pequeno número de células-tronco, sendo formadas cerca de 10^{10} células por dia. Este processo inclui auto-renovação das células-tronco, restrição da progênie

das células-tronco para uma única linhagem celular, proliferação e diferenciação das células precursoras em células maduras e funcionais (KAUSHANSKY, 2006). Para que isso ocorra, é necessário um microambiente adequado na medula óssea, capaz de sintetizar fatores de crescimento, acomodar as células em desenvolvimento e favorecer as interações entre diferentes células. Este microambiente é fornecido pelo estroma medular constituído por fibroblastos, adipócitos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais dos capilares sinusóides e pela matriz extracelular (ABBOUD; LICHTMAN, 2006). 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 sobrevida celular (KAUSHANSKY, 2006).

Os progenitores e precursores da linhagem eritróide constituem cerca de um terço das células da medula óssea. Os eritrócitos caracterizam-se principalmente pela síntese de hemoglobina necessária ao transporte de oxigênio para os tecidos. As unidades formadoras de *burst* eritróide (BFU-E) dão origem às unidades formadoras de colônia eritróide (CFU-E), que formam colônias de precursores morfologicamente reconhecíveis (proeritroblastos, eritroblastos basófilo, eritroblastos policromático, eritroblastos ortocromático e reticulócitos) em 2 a 5 dias (BULL, 2006).

Os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) incluem neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os neutrófilos são granulócitos produzidos a partir de células progenitoras multipotenciais, sob ação de mediadores, especialmente os fatores estimuladores de colônias granulocíticas e monocíticas (G-CSF e GM-CSF). A partir do precursor mielóide, passando por fases de proliferação e diferenciação 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).

Os eosinófilos são produzidos a partir do precursor mielóide, sob estímulo de GM-CSF, IL-3 e IL-5. Possuem atividade pró-inflamatória e citotóxica, participando da 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 PMNs 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).

O sistema mononuclear fagocitário (SMF) 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 diferenciando-se em 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 subdivididos, de acordo com a função, em células T auxiliares (*helper*), que sob estimulação antigênica secretam citocinas envolvidas na proliferação e diferenciação de células T e B, macrófagos e outros leucócitos, e 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 (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A trombopoetina (TPO) é um hormônio produzido constitutivamente pelo fígado e atua sinergicamente com outras citocinas, como um importante regulador de células mais primitivas. É um fator de crescimento primário que induz a proliferação e maturação dos progenitores dos megacariócitos, formando os trombócitos ou plaquetas. A produção das plaquetas acontece por fragmentação citoplasmática e alterações no citoesqueleto dos megacariócitos. As plaquetas têm importante função na hemostasia e vivem em média 10 dias na circulação. Desordens na trombopoese que prejudicam a produção de plaquetas podem causar trombocitopenias, favorecendo os sangramentos (DEUTSHC; TOMER, 2006).

1.1.1 Função efetora dos neutrófilos

Neutrófilos e outros leucócitos fagocíticos são células especializadas no reconhecimento, internalização e morte intracelular de bactérias **(**EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008).

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores. São fagócitos eficientes que englobam e degradam microrganismos utilizando mecanismos oxidativos e não oxidativos (PHAM, 2006). Após a internalização dos microrganismos, os neutrófilos passam a consumir grandes quantidades de oxigênio e os patógenos são mortos pela exposição a espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas pelo complexo enzimático NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase) oxidase, presente na membrana do fagossomo, e por enzimas dos grânulos neutrofílicos (ROOS; VAN BRUGGEN; MEISCHL, 2003). Na doença granulomatosa crônica (DGC), caracterizada por

um defeito no sistema NADPH oxidase, os pacientes demonstram inabilidade em gerar EROs e, por isso, apresentam infecções bacterianas e fúngicas recorrentes (PHAM, 2006).

Em condições normais, os neutrófilos circulam livremente em um estado dormente com baixa eficiência de captura e prisão no endotélio quiescente. A resposta inflamatória aguda causada por infecção ou lesão tecidual recruta leucócitos para o local da lesão e mediadores pró-inflamatórios induzem alterações no endotélio vascular que sinalizam para neutrófilos circulantes rolar, aderir e atravessar o endotélio (EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008). O reconhecimento inicial é mediado por macrófagos residentes e mastócitos, levando à produção de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, eicosanóides e produtos da cascata proteolítica. Proteínas plasmáticas e leucócitos, normalmente restritos aos vasos sanguíneos, vão para os tecidos no local da infecção ou lesão. Há saída seletiva de neutrófilos, proporcionada pela ligação de selectinas da célula endotelial com integrinas e receptores de quimiocinas dos leucócitos. Os neutrófilos são ativados pelo contato direto com patógenos e pela ação das citocinas secretadas pelas células residentes nos tecidos (MEDZHITOV, 2008).

Quando os neutrófilos migram do sangue periférico para o local da infecção, a NADPH oxidase existe em diferentes estados: em repouso (*resting*), iniciada (*primed*), ativada ou inativada (EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008), conforme mostrado na Figura 1. O estado de repouso é encontrado nos neutrófilos dormentes enquanto o *primed* pode ser induzido por uma variedade de processos, entre os quais adesão de neutrófilos, ou por agentes como citocinas pró-inflamatórias, LPS (lipopolissacarídeo) e outros. A exposição de neutrófilos *primed* a um segundo estímulo como fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina) provoca uma resposta mais forte e rápida do que a resposta induzida pelo mesmo estímulo em neutrófilos em repouso, fenômeno este observado nos estudos de Bitzinger e colaboradores (2008). Finalmente, a inativação da NADPH oxidase

ocorre no sítio inflamatório para limitar a secreção de EROs e a reação inflamatória (EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008).

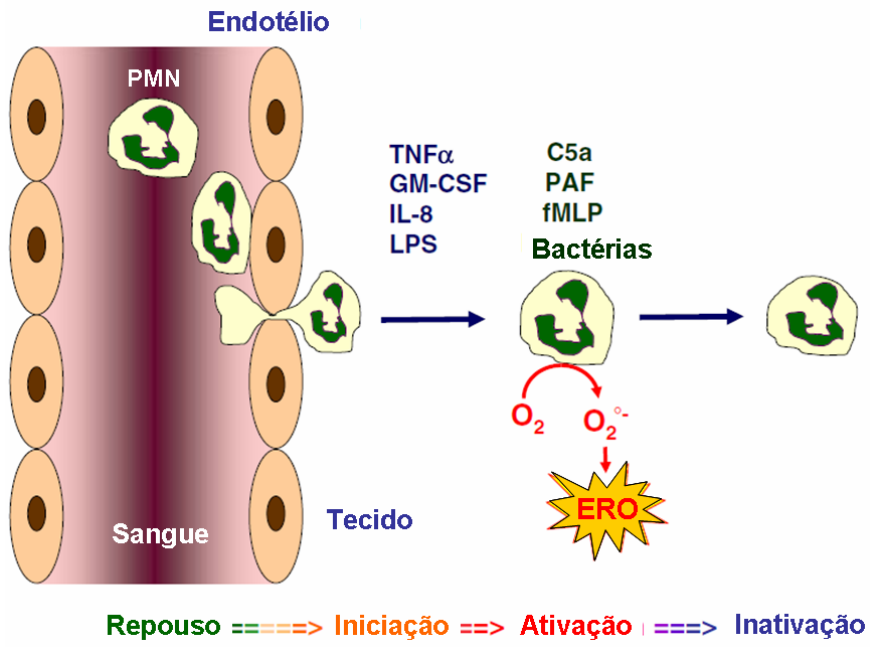

Figura 1. Etapas de ativação dos neutrófilos. Adaptado de El-Benna, Dang e Gougerot-Pocidalo, 2008

NADPH oxidase, ou oxidase do *burst* respiratório, é uma enzima que cataliza a redução de oxigênio (O_2) a superóxido ($O_2^{-\cdot}$) por meio da transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular (BABIOR, 2002). Há produção de EROs pelos fagócitos através do *burst* oxidativo, caracterizado por rápido aumento do consumo de oxigênio (EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008). $O_2^{-\cdot}$ reage consigo mesmo, espontaneamente ou sob catálise pela superóxido dismutase, para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. Nos neutrófilos e monócitos, H_2O_2 é então utilizado para oxidar Cl^-, em uma reação catalizada pela mieloperoxidase, para formar ácido hipocloroso (HOCl), utilizado para matar bactérias. Eosinófilos também contêm NADPH oxidase, mas sua peroxidase não cataliza a oxidação de Cl^- e sim a oxidação de Br^- para ácido hipobromoso (HOBr), outro agente

microbicida. Reações adicionais oxidantes incluem oxigênio *singlet* ($^1O_2$) e radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), quando H_2O_2 oxida Cu^+ ou Fe^{2+} (BABIOR, 2002).

Óxido nítrico (NO) também desempenha função na morte de patógenos. A produção de NO é pequena em neutrófilos, mas abundante em macrófagos ativados. NO reage com $O_2^{-\bullet}$ formando peroxinitrito ($ONOO^-$), que se combina com dióxido de carbono (CO_2) dando como produto nitrocarbonato (O_2NOCO_2) reativo. NO também pode reagir com HOCl, produzindo cloreto de nitrila (NO_2Cl), outro composto altamente tóxico. Estes produtos reativos de fagócitos indicam ampla variedade de agentes empregados por estas células para matar bactérias (BABIOR, 2002).

NADPH oxidase é altamente complexa (Figura 2), não somente pelo número de subunidades, mas também pela estrutura e interações entre elas. Quatro subunidades são específicas para a enzima: gp91phox (glicoproteína de 91 KDa; phox: *phagocyte oxidase*), p22phox, p47phox e p67phox (BABIOR, 2002). O flavocitocromo b_{558} é o componente central associado à membrana e é composto de uma subunidade protéica glicosilada de 91 KDa, ligada não-covalentemente em um complexo estabilizado à subunidade de 22 KDa (p22phox) que é essencial para maturação e expressão estável de flavocitocromo b_{558}. As proteínas citosólicas são p47phox, p67phox e p40phox, que interagem entre si para formar um complexo, e proteínas-G Rac1, em monócitos, ou Rac2, em neutrófilos (EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008).

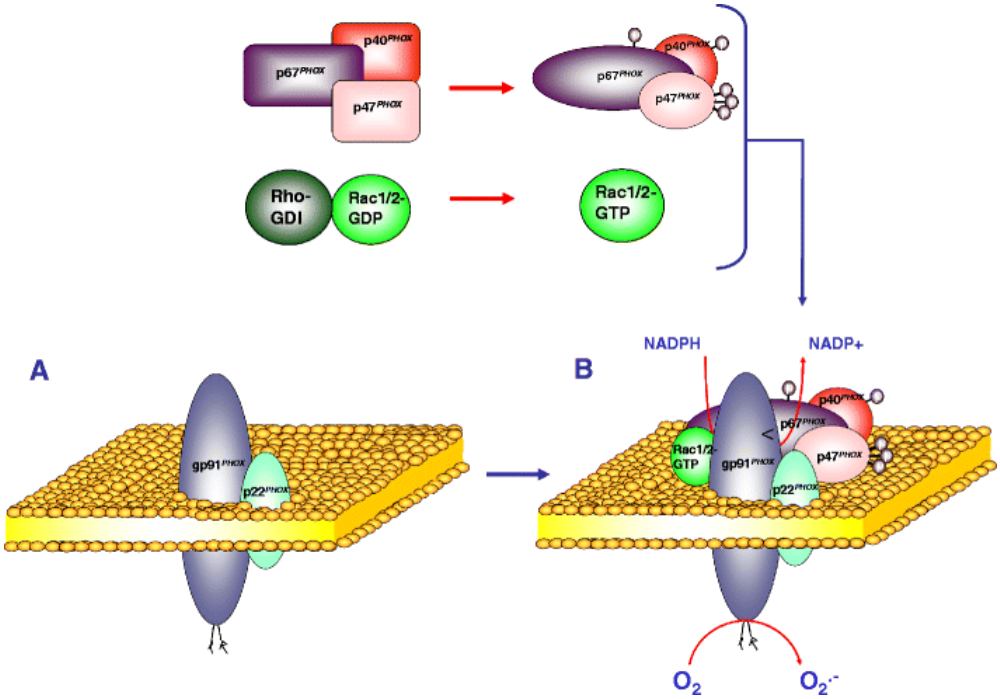

Figura 2. Complexo NADPH oxidase. Adaptado de El-Benna, Dang e Gougerot-Pocidalo, 2008

A separação espacial dos componentes do complexo enzimático garante que a enzima esteja dormente nas células em repouso. Em resposta à estimulação, os componentes citosólicos migram quase que instantaneamente para a membrana onde se agrupam com o flavocitocromo b_{558} para formar a enzima ativa, um processo que é regulado por interações entre as proteínas e por fosforilação (EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008).

A ativação da oxidase ocorre pela mobilização de dois componentes citosólicos para a membrana plasmática e ligação ao flavocitocromo b_{558}. A chave para ativação da oxidase é a fosforilação de p47phox. Sob ação da proteína kinase C, isto é, ativação do neutrófilo com PMA-acetato miristato de forbol, a proteína p47 é fosforilada. A fosforilação é necessária para ativação da oxidase e causa uma alteração na conformação de p47phox. Quando a proteína é fosforilada ela se abre e auxilia na retenção dos componentes citosólicos na membrana (BABIOR, 2002).

Estudos de fagocitose utilizam estímulos como microrganismos opsonizados, ésteres de forbol, como o acetato de forbol miristato (PMA) e peptídeos que mimetizam partes de

proteínas de algumas bactérias, como o N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). Como resposta a estes estímulos, os neutrófilos promovem um aumento acentuado do consumo de oxigênio, o *burst* respiratório, a partir do qual há formação das EROs, por meio da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase em parte da membrana plasmática que forma o fagossomo (HALLIWELL, 2006).

1.2 Hemostasia

O sistema hemostático tem por funções manter o sangue em estado fluido sob condições normais e interromper sangramentos quando há lesão vascular (MACKMAN; TILLEY; KEY, 2007). Para tanto, ocorre uma série de eventos que envolvem vasos sanguíneos, plaquetas, proteínas da coagulação, fibrinólise e anticoagulantes naturais.

As células endoteliais inibem a coagulação sanguínea 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 (HARRISON, 2005).

Quando há lesão vascular, ocorre exposição de colágeno e proteínas subendoteliais (Figura 3). 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 através dos receptores ativados gp IIb/IIIa e $\alpha_2\beta_1$. Há sinalização intracelular e ativação plaquetária, causando degranulação das plaquetas com liberação de ADP, geração de tromboxano, ativação do complexo gp IIb/IIIa, exposição de fosfolipídeos aniônicos e geração de microvesículas procoagulantes. Estes eventos facilitam o recrutamento local de plaquetas vizinhas, ocorrendo então agregação mediada pelo fibrinogênio e fator de von Willebrand, por ligação a gp IIb/IIIa ativada nas células adjacentes. A exposição de fosfolipídeos 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).

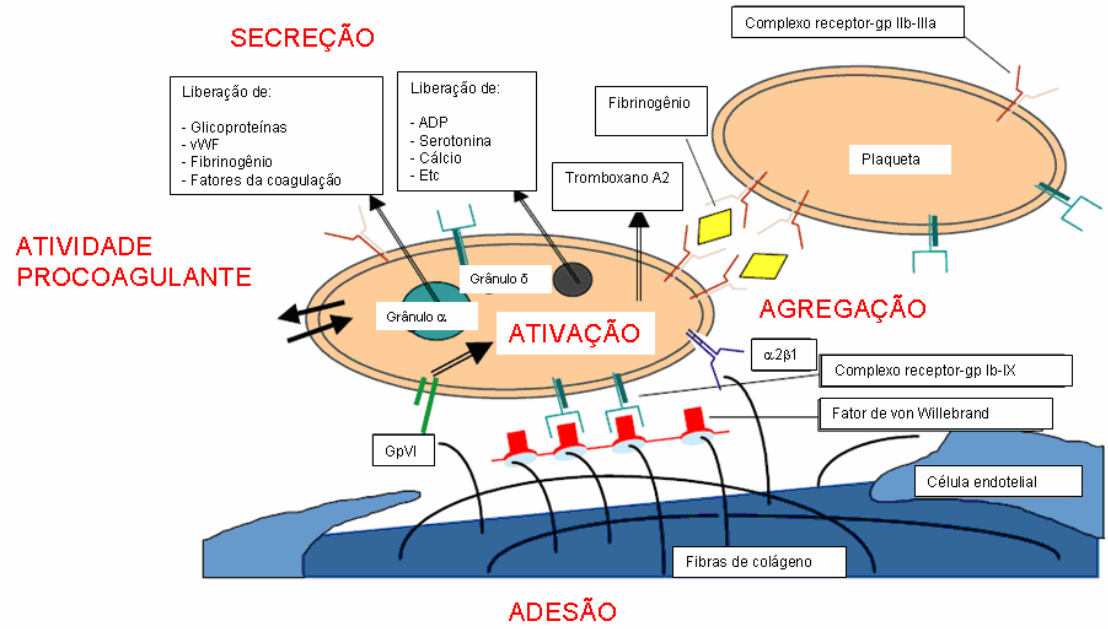

Figura 3. O papel das plaquetas na hemostasia. Adaptado de Harrison, 2005

Embora seja tradicional dividir a hemostasia em primária e secundária e o sistema da coagulação em vias intrínseca e extrínseca, essa divisão não ocorre *in vivo*, pois todos os eventos são integrados (Figuras 4 e 5). 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/cininogênio de alto peso molecular ativado. O fator XIa, bem como fator tecidual/fator VIIa e fosfolipídeos, converte fator IX a IXa. O fator IXa, em conjunto com os fatores VIIIa e fosfolipídeos (complexo *tenase*), bem como fator tecidual/fator VIIa e fosfolipídeos, converte o fator X a Xa. O complexo protrombinase (fator Va e fosfolipídeos) é ativado pelo fator Xa e converte protrombina em trombina, que por sua vez converte fibrinogênio em fibrina, caracterizando a via comum (KRUPICZOJC; SCOTTON; CHAMBERS, 2008).

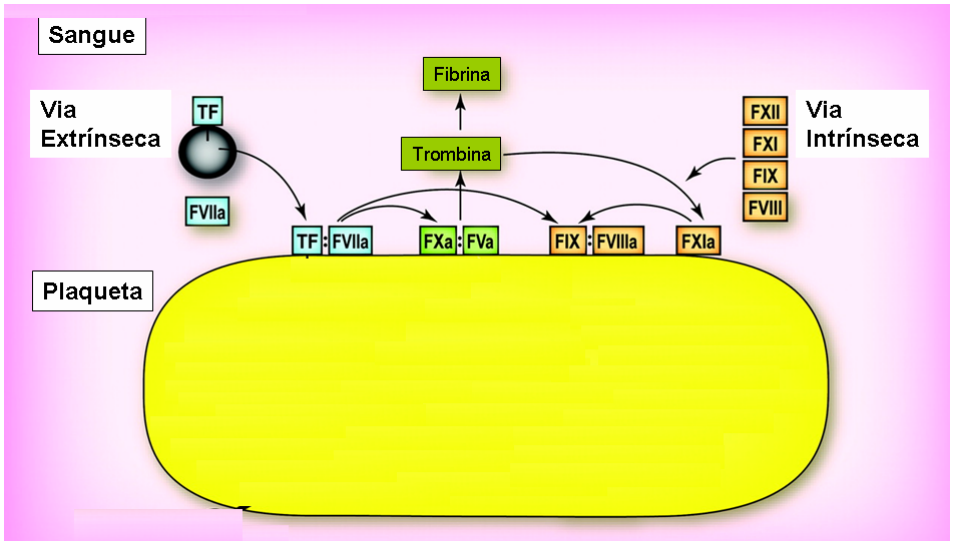

Figura 4. Vias da coagulação para a geração de trombina e fibrina. Adaptado de Mackman; Tilley; Key, 2007

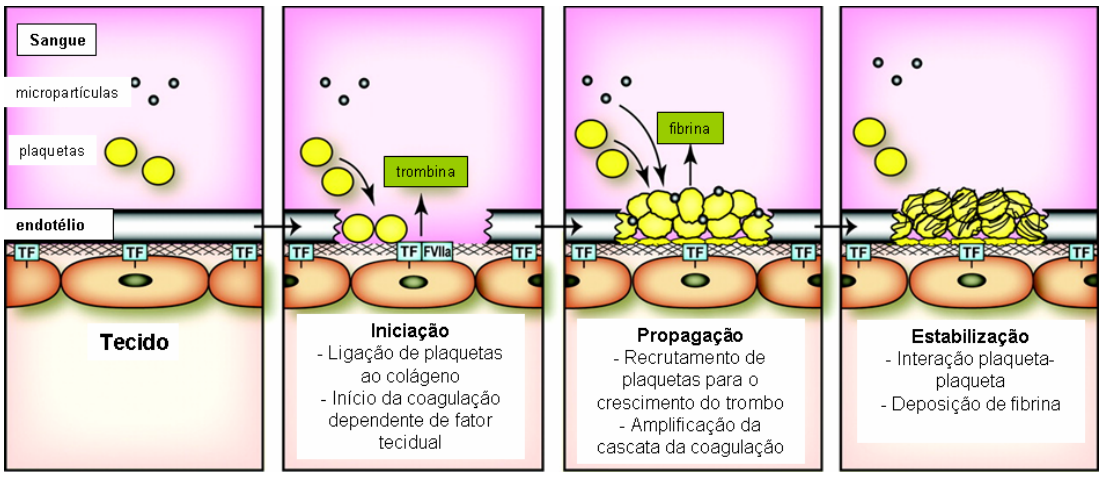

Figura 5. Formação do coágulo de fibrina no local da lesão vascular. Adaptado de Mackman; Tilley; Key, 2007

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 (*tecidual factor pathway inhibitor*, 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 (FRANCO, 2001).

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 (COLVIN, 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.

Fármacos podem ocasionar lesão hepática e, na insuficiência hepática aguda, ocorre diminuição da síntese tanto dos fatores de coagulação como dos fatores fibrinolíticos. Desta forma, os níveis dos fatores II, V, VII e X são reduzidos após lesão hepática. Os fatores V e VII que têm meia-vida curta (12 a 15 horas e 2 a 6 horas, respectivamente), alteram-se muito precocemente (OLIVEIRA; NETO, 2004). A ativação da cascata da coagulação, iniciada pelo fator tecidual, leva ao consumo dos fatores II, V, VII e X devido à lesão, entretanto a síntese do fator VIII é mantida por causa de sua produção extra-hepática (CHIU et al., 2007; KERR et al., 2003).

Todas as proteinases da cascata da coagulação, incluindo o fator Xa, são sintetizadas como zimogênios inativos no fígado (KRUPICZOJC; SCOTTON; CHAMBERS, 2008). O fator VII é ligante natural do fator tecidual e parceiro nas funções hemostáticas e não

hemostáticas. Aproximadamente 99% do fator VII circula como zimogênio inativo. A ativação ocorre após dano tecidual. Embora ativado, o fator VII não expressa sua funcionalidade procoagulante total até ser ligado ao fator tecidual (MONROE; KEY, 2007).

1.3 Função hepática

Reação adversa a medicamentos constitui a principal causa de insuficiência hepática aguda em países ocidentais desenvolvidos, sendo responsável por mais da metade dos casos relatados na literatura. Grande parte dos fármacos utilizados é biotransformada pelo fígado, sendo responsáveis direta ou indiretamente pelas lesões teciduais do órgão (GILL; STERLING, 2001).

Dois mecanismos básicos estão associados ao dano do tecido hepático. Primeiro, a hepatotoxicidade intrínseca, em que o fármaco é considerado uma toxina direta e se caracteriza pela atuação dose-dependente. Segundo, o mecanismo idiossincrático, em que o fármaco age como uma toxina indireta e se caracteriza como resultado da lesão hepática imune deflagrada pelo fármaco ou pelo seu metabólito, em pacientes susceptíveis. Apesar da relativa frequência destas lesões, há pouca informação a respeito dos efeitos em longo prazo. Algumas razões para isto incluem: falha em considerar medicamentos como causa primária de função anormal do fígado, levando a diagnóstico errado; dificuldade em estabelecer um diagnóstico definitivo de lesão induzida por fármacos excluindo outros diagnósticos; e a crença de que, com poucas exceções, a hepatotoxicidade induzida por fármacos é reversível e que após a retirada da droga os pacientes não necessitam de acompanhamento (AITHAL; DAY, 1999).

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

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. São índices que se baseiam em medidas de substâncias liberadas no dano tissular ou análise de substâncias metabolizadas ou produzidas pelo fígado (MOTTA, 2003).

A doença hepática produz alterações na hemostasia pela síntese diminuída dos fatores da coagulação e pela produção de proteínas qualitativamente anormais. 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). Desta forma, tanto a avaliação bioquímica como a hemostática são importantes na avaliação da função hepática.

1.4 Fármacos

A investigação dos efeitos provocados pelos fármacos é importante, pois estes podem interferir em vários processos orgânicos fundamentais ao funcionamento de órgãos e no controle da produção de células sanguíneas, que é finamente regulada e representa papel relevante nas funções vitais do organismo.

Nestas investigações deve-se determinar a relação dose/efeito dos fármacos, visto que há variabilidade entre pacientes, devido a diferenças na farmacocinética, principalmente na absorção e eliminação, e, além disso, pode haver também 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). Nos estudos de Gandhi e Singh (2004), a avaliação de linfócitos sanguíneos de pacientes hansênicos e tuberculosos tratados revelou a ocorrência de danos ao DNA. Pacientes com baixa resistência ao *M. leprae* necessitavam de maior dosagem dos antibióticos e tratamento mais prolongado, aumentando

os danos ao DNA. Este exemplo evidencia a importância de se determinar os níveis plasmáticos dos fármacos que causam os efeitos adversos, visando reduzir estes danos.

Há algumas variáveis que podem interferir nos resultados dos exames hematológicos e bioquímicos, como idade e sexo dos animais, a dieta e também variabilidades que podem ocorrer devido a fatores como o ambiente e estresse (PETTERINO; ARGENTINO-STORINO, 2006). É importante, portanto, que sejam padronizadas as condições ideais para realização dos experimentos, permitindo que os resultados sejam adequadamente interpretados e as alterações relacionadas ou não à administração dos fármacos estudados.

1.4.1 Claritromicina

Claritromicina é um antibiótico macrolídeo sistêmico semi-sintético (Figura 6). O fármaco difere estruturalmente da eritromicina pela metilação de um grupo hidroxila na posição 6 do anel lactônico (ADACHI; MORIMOTO; KONDOH, 1988). 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). Alguns produtos de degradação da eritromicina, como a forma anidroemicetônica, aumentam a motilidade do trato gastrintestinal e contribuem com os efeitos adversos gastrintestinais do fármaco (ZHANEL et al., 2001).

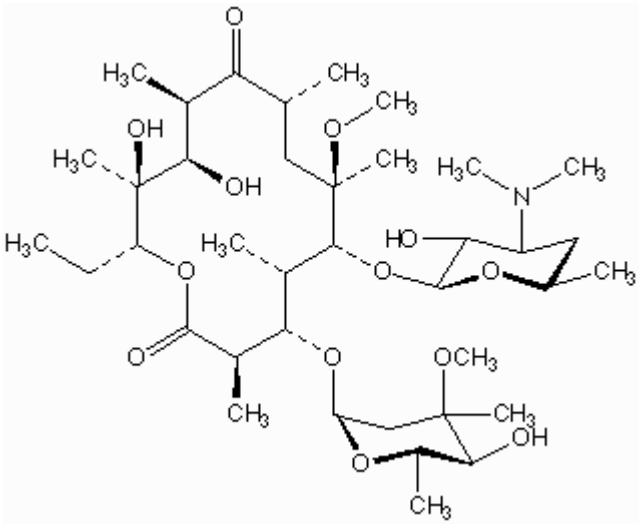

Figura 6. Estrutura química da claritromicina. Nome químico: 6-O-metil-eritromicina

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 polipeptídios (PISCITELLI; DANZIGER; RODVOLD, 1992). Não se liga, todavia, aos ribossomos 80S dos mamíferos, o que explica, em parte, sua toxicidade seletiva (KOROLKOVAS, 2004).

O metabólito principal da claritromicina, 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 a meia-vida dos dois fármacos tende a ser mais longa com doses maiores. O comportamento farmacocinético não-linear da claritromicina, associado ao 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, 2007).

O complexo do *M. avium* engloba dois organismos relacionados, *M. avium* e *M. intracellulare*. São organismos amplamente distribuídos no ambiente sendo a água e solo seus reservatórios naturais (THORELL; HUCHZERMEYER; MICHEL, 2001). 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, como a claritromicina e azitromicina, e de rifabutina melhorou muito os resultados terapêuticos (KATOCH, 2004).

Estudos *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* (JI et al., 1993) e tem sido utilizada em associação com a minociclina no tratamento da hanseníase lepromatosa (CHAMBERS, 2007). 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). Foi observada atividade bactericida contra *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Chlamydia trachomatis* (NEU, 1991).

Claritromicina é habitualmente administrada duas vezes ao dia, na dose de 250 mg, para crianças acima de 12 anos e adultos com infecção leve a moderada. Indicam-se doses mais altas, como 500 mg, duas vezes ao dia, para infecções mais graves ou para as causadas por microrganismos mais resistentes como o *Haemophilus influenzae*. É também utilizada na dose de 500 mg, 1 a 2 vezes ao dia, durante 14 dias, associada com lansoprazol e amoxicilina para erradicar o *H. pylori*. Na profilaxia e tratamento de infecção disseminada causada pelo complexo *M. avium*, em pacientes com SIDA, bem como no tratamento de doença pulmonar nos não infectados pelo HIV, é utilizada na dose de 500 mg, 2 vezes ao dia, associada ao etambutol. Os macrolídeos são utilizados no tratamento de infecções causadas por micoplasmas, várias espécies de *Legionella*, clamídias, difteria, coqueluche, infecções estreptocócicas, estafilocócicas, por *Campylobacter*, tétano, sífilis, encefalite e toxoplasmose,

e, nestes casos, o tratamento inclui diversos esquemas de administração com dose e duração variáveis dependendo do tipo e da gravidade da doença (CHAMBERS, 2007).

A absorção da claritromicina ocorre no trato gastrintestinal, 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 (FRASCHINI, SCAGLIONE E DEMARTINI, 1993).

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 250 mg ou 1,2 g de claritromicina, calculou-se que a meia-vida de eliminação média é de 4 e 11 horas, respectivamente (FERRERO; BOPP; MARSH, 1990).

Os efeitos adversos mais comuns envolvem o trato digestivo. Em estudos clínicos, foram observados diarréia, náuseas, alterações no paladar, dispepsia e desconforto abdominal (ZHANEL et al., 2001). Outros raros efeitos informados incluem candidíase oral, estomatite, vômitos, flatulência, constipação, descoloração da língua, pancreatite e laringismo (PISCITELLI; DANZIGER; RODVOLD, 1992).

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). Em relação às alterações hematológicas e

hemostáticas, foi relatado leucopenia e aumento do tempo de protrombina em 1% dos pacientes adultos (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.

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 grave, mas é aparentemente reversível (CASSELL; DRNEC; WAITES, 1991; POIRIER, 1991).

Os antibióticos macrolídeos atuam como imunomoduladores em doenças inflamatórias crônicas do trato respiratório através da inibição da produção de várias citocinas pro-inflamatórias e de efeitos inibitórios sobre o RNA mensageiro de fatores de transcrição destas citocinas (ISHIDA; ABE; HARABUCHI, 2007). A claritromicina, devido aos seus efeitos antiinflamatórios, bloqueia a formação de moléculas de adesão, necessárias à migração dos neutrófilos para os tecidos. Assim, os macrolídeos reduzem 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 dos neutrófilos nas vias aéreas dos pacientes leva também a redução da liberação de ânion superóxido, leucotrieno B_4 e defensinas destas células (TAMAOKI; KADOTA; TAKIZAWA, 2004).

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). Os antibióticos 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 (Figura 7) com atividades antimicobacteriana e antiinflamatória que se encontra 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 pelo complexo *M. avium* (KATOCH, 2004).

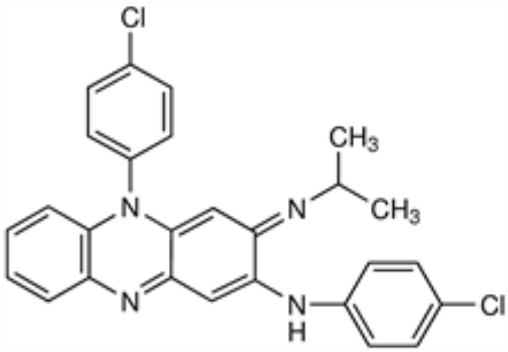

Figura 7. Estrutura química da clofazimina. Nome químico: 3-(*p* -cloroanilino)-10-(*p* -clorofenil)-2,10-dihidro-2-isopropiliminofenazina.

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 sequências 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 (YANO et al., 2010; YAWALKAR; VISCHER, 1979).

Clofazimina apresenta diferentes efeitos sobre o sistema imune, como aumento do número e tamanho dos lisossomos e fagolisossomos de macrófagos, inibição da solubilização de complexos imunes mediada pelo complemento e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelos leucócitos polimorfonucleares devido à estimulação de fosfolipase A2. Como é transportada pelo LDL (*low-density lipoprotein*), e adipócitos e células do sistema monocítico fagocitário possuem receptores específicos para o LDL, a clofazimina possui a propriedade de se concentrar em um dos principais alvos micobacterianos, as células fagocíticas. Estes efeitos, somados à ação antibacteriana direta, explicam seus efeitos antimicobacterianos (O'CONNOR; O'SULLIVAN; O'KENNEDY, 1995).

Este fármaco causa perturbações na membrana no *Staphylococcus aureus* e efeitos nos transportadores de potássio. Tem alto potencial redox e pode resultar na geração de peróxido de hidrogênio. Pode inibir o crescimento bacteriano por interferir com o transporte de elétrons (CLOFAZIMINE, 2008).

Clofazimina é bactericida contra *M. leprae in vivo*, porém a avaliação dos efeitos do fármaco é difícil visto que *M. leprae* não pode ser cultivado *in vitro*. É também bactericida contra *M. tuberculosis* e *M. marinum in vitro*, mas parece ser só bacteriostática *in vitro* contra outras micobactérias, inclusive o complexo *M. avium* (YANO et al., 2010; 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 (YAWALKAR; VISCHER, 1979). O fármaco não é distribuído para o cérebro, mas atravessa a placenta e 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 (CLOFAZIMINE, 2008).

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. Podem ocorrer reações gastrintestinais como náusea, vômito e diarréia devido à deposição de cristais na mucosa intestinal (O'CONNOR; O'SULLIVAN; O'KENNEDY, 1996).

Clofazimina prejudica a fertilidade em ratos, em dose 25 vezes maior que a utilizada em humanos. Em camundongos, a toxicidade fetal é 12 a 25 vezes a dose em humanos, ocasionando retardo da ossificação craniana fetal, aumento da incidência de abortos e natimortos e prejuízo da sobrevida neonatal. A pele e o tecido adiposo da prole tornam-se descorados aproximadamente três dias após o nascimento, o que é atribuído à presença de clofazimina no leite materno. Com relação à genotoxicidade, clofazimina inibe o crescimento de fibroblastos na concentração de 2,5 mg/mL, provocando alterações relacionadas à dose em índices mitóticos e elevada incidência de aberrações cromossômicas em camundongos tratados com 40 mg/kg/dia, durante sete dias. O fármaco não é teratogênico em animais de laboratório em doses equivalentes a oito vezes à dose diária humana, em coelhos, e 25 vezes, em ratos. Níveis elevados de albumina, bilirrubina sérica e AST, eosinofilia e hipocalemia foram encontrados em estudos utilizando animais (CLOFAZIMINE, 2008).

Não há 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).

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 são usadas no tratamento de crianças, porém

doses mais altas de até 50mg/dia ou 4mg/kg diárias, também foram utilizadas (HAWKINS; GOLD; WHIMBEY, 1986). Um esquema de tratamento que inclui um macrolídeo, claritromicina ou azitromicina, em combinação com etambutol e clofazimina, 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).

Um regime terapêutico efetivamente superior para o tratamento de infecções por *M. avium* disseminadas em pacientes com SIDA não foi estabelecido. Porém, há relato 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.

O tratamento para hanseníase resistente a dapsona e hanseníase multibacilar sensível a dapsona consiste da administração oral de 50 a 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).

1.4.3 Uso dos fármacos em associação

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 efeitos diferentes daqueles observados nos fármacos utilizados isoladamente ou mesmo não ocorrer nenhuma alteração, 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, frequentemente resulta em interações farmacológicas com significância clínica (MALFARÁ; UYEMURA; QUEIROZ, 2005). A claritromicina atua como inibidor dessa isoforma enzimática (GALETIN et al., 2006), e é responsável pela inibição da glicoproteína P, um transportador de múltiplas drogas, sendo responsável pelo efluxo de fármacos das células (PORRAS et al., 2005).

Infecção disseminada causada pelo complexo *Mycobacterium avium* ocorre em portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), com aumento da morbidade e mortalidade destes pacientes. Além disso, pacientes imunocompetentes podem desenvolver doença pulmonar crônica devido à ação deste patógeno. O tratamento da infecção disseminada é de longo prazo e deve incluir dois agentes antimicrobianos. A associação entre claritromicina e etambutol é o regime terapêutico padrão, mas alternativas incluem azitromicina, ciprofloxacina, clofazimina e amicacina. A combinação claritromicina e clofazimina tem se mostrado eficaz, com boa tolerância dos fármacos (FIELD; COWIE, 2003).

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 (BRASIL, 1999). Outros protocolos de tratamento têm sido utilizados como, por exemplo, o esquema ROM (rifampicina, ofloxacina e minociclina). Além disso, claritromicina também exibe ação bactericida sobre o *M. leprae* em pacientes portadores da hanseníase (JI et al., 1993).

Em um estudo anterior, observamos alterações em parâmetros hematológicos, hemostáticos e bioquímicos, decorrentes do uso de clofazimina e claritromicina de forma isolada. Há alguns dados na literatura referentes aos efeitos adversos ocasionados por ambos os fármacos (PAINA; QUEIROZ; SOUZA, 2008), entretanto, não há relatos que indiquem alterações destes parâmetros quando os fármacos são administrados em associação. Como a claritromicina é um inibidor do sistema enzimático citocromo P450 (CYP 450) e também da glicoproteína P, o que pode determinar interações farmacológicas, no presente estudo nos propomos a investigar os possíveis efeitos adversos decorrentes da administração dos medicamentos isolados e associados pela avaliação de parâmetros hematológicos, hemostáticos e bioquímicos, e ainda estabelecer a correlação dos efeitos adversos com a dose dos fármacos e desta com a concentração plasmática.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Determinar as concentrações plasmáticas e os possíveis efeitos adversos provocados pela clofazimina e claritromicina em monoterapia e associação, nos esquemas de doses únicas e múltiplas, administrados a ratos machos Wistar.

2.2 Objetivos específicos

Nos diferentes esquemas de tratamento:

- Realizar avaliação quantitativa e funcional dos leucócitos polimorfonucleares;

- Realizar avaliação quantitativa das plaquetas e dos fatores da coagulação por meio da determinação do tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e dosagem dos fatores VII e X;

- Determinar os níveis plasmáticos de γ-glutamiltransferase e bilirrubinas total e direta;

- Correlacionar as possíveis alterações hematológicas, hemostáticas e bioquímicas com as doses dos fármacos isolados e associados;

- Correlacionar as doses com as concentrações plasmáticas dos fármacos isolados e associados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos machos jovens, da espécie *Rattus novergicus*, linhagem Wistar, pesando entre 220 e 250 gramas, provenientes do Biotério Central de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, somente nos experimentos que envolveram os pilotos de anestésicos (item 3.1.5). Para garantir a confiabilidade dos resultados, em todos os demais experimentos utilizamos ratos SPF (*specific pathogen free*) do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os animais foram alojados em número máximo de cinco, em caixas de polipropileno medindo 50 x 35 x 15 cm. As caixas foram mantidas em salas com temperatura ambiente constante (22 a 24ºC), 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 aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto – USP (Parecer 05.1.297.53.0) (Anexo 1).

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. Embora tenha risco de injeção dentro do trato gastrintestinal, esta é uma complicação rara.

3.1.3 Esquemas de dosagem de clofazimina e claritromicina

Para todos os regimes de dosagem, foi escolhida a dose de 100 mg/kg de peso corpóreo, baseado nos resultados encontrados por Paina, Queiroz e Souza (2008) em que os fármacos foram administrados em monoterapia, tendo sido testadas as doses únicas de 50, 100 e 200 mg/kg e a dose múltipla de 100 mg/kg de cada fármaco.

Os fármacos foram administrados seguindo o esquema:

3.1.3.1 REGIME DE DOSAGEM: dose única – monoterapia

Controle

- Grupo controle do excipiente (DMSO) (n=7): solução de dimetilsulfóxido.

Clofazimina

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

Claritromicina

- Grupo CRT (n=7): solução de 100 mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido.

3.1.3.2 REGIME DE DOSAGEM: dose única – politerapia

Controle

- Grupo controle do excipiente (DMSO) (n=7): solução de dimetilsulfóxido.

Clofazimina e claritromicina

- Grupo CFZ x CRT (n=7): solução de 100 mg de clofazimina/kg de peso associada a 100 mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido.

3.1.3.3 REGIME DE DOSAGEM: doses múltiplas – monoterapia e politerapia

Foi realizado um estudo piloto para estabelecer os esquemas de administração e coleta dos grupos controle e tratados deste regime de dosagem (Figura 8).

Os fármacos foram administrados seguindo o esquema:

- **Doses múltiplas – monoterapia**

Clofazimina

- Grupo CFZ (n=10): 100 mg de clofazimina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24 h, por 2 dias consecutivos.
- Grupo CFZ (n=10): 100 mg de clofazimina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24 h, por 3 dias consecutivos.
- Grupo CFZ (n=10): 100 mg de clofazimina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24 h, por 4 dias consecutivos.
- Grupo CFZ (n=10): 100 mg de clofazimina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24 h, por 5 dias consecutivos.

Claritromicina

- Grupo CRT (n=10): 100 mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24 h, por 2 dias consecutivos.
- Grupo CRT (n=10): 100 mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24 h, por 3 dias consecutivos.
- Grupo CRT (n=10): 100 mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24 h, por 4 dias consecutivos.

- Grupo CRT (n=10): 100 mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24 h, por 5 dias consecutivos.

- **Doses múltiplas – politerapia**

Clofazimina e claritromicina

- Grupo CFZ x CRT (n=10): 100 mg de clofazimina/kg de peso associada a 100mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24 h, por 2 dias consecutivos.
- Grupo CFZ x CRT (n=10): 100 mg de clofazimina/kg de peso associada a 100mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24h, por 3 dias consecutivos.
- Grupo CFZ x CRT (n=10): 100 mg de clofazimina/kg de peso associada a 100mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24h, por 4 dias consecutivos.
- Grupo CFZ x CRT (n=10): 100 mg de clofazimina/kg de peso associada a 100mg de claritromicina/kg de peso, em dimetilsulfóxido, a cada 24h, por 5 dias consecutivos.

Em cada grupo, a coleta foi realizada após 2 h da última dose em metade dos animais (n=5) e após 24 h da última dose nos animais restantes (n=5).

3.1.4 Estabelecimento das doses a partir dos pesos dos animais

Para o estabelecimento do volume correto de fármaco a ser injetado em cada animal para a obtenção da dosagem final de 100 mg/kg de peso, foram realizados cálculos a partir dos pesos dos ratos. Cada animal foi pesado antes da administração da dose correspondente, tanto em regime de dose única como em doses múltiplas. Neste último esquema de dosagem, cada rato recebeu o tratamento correspondente durante todos os dias do seguimento e foi eutanasiado após o término do mesmo, para a coleta das amostras biológicas.

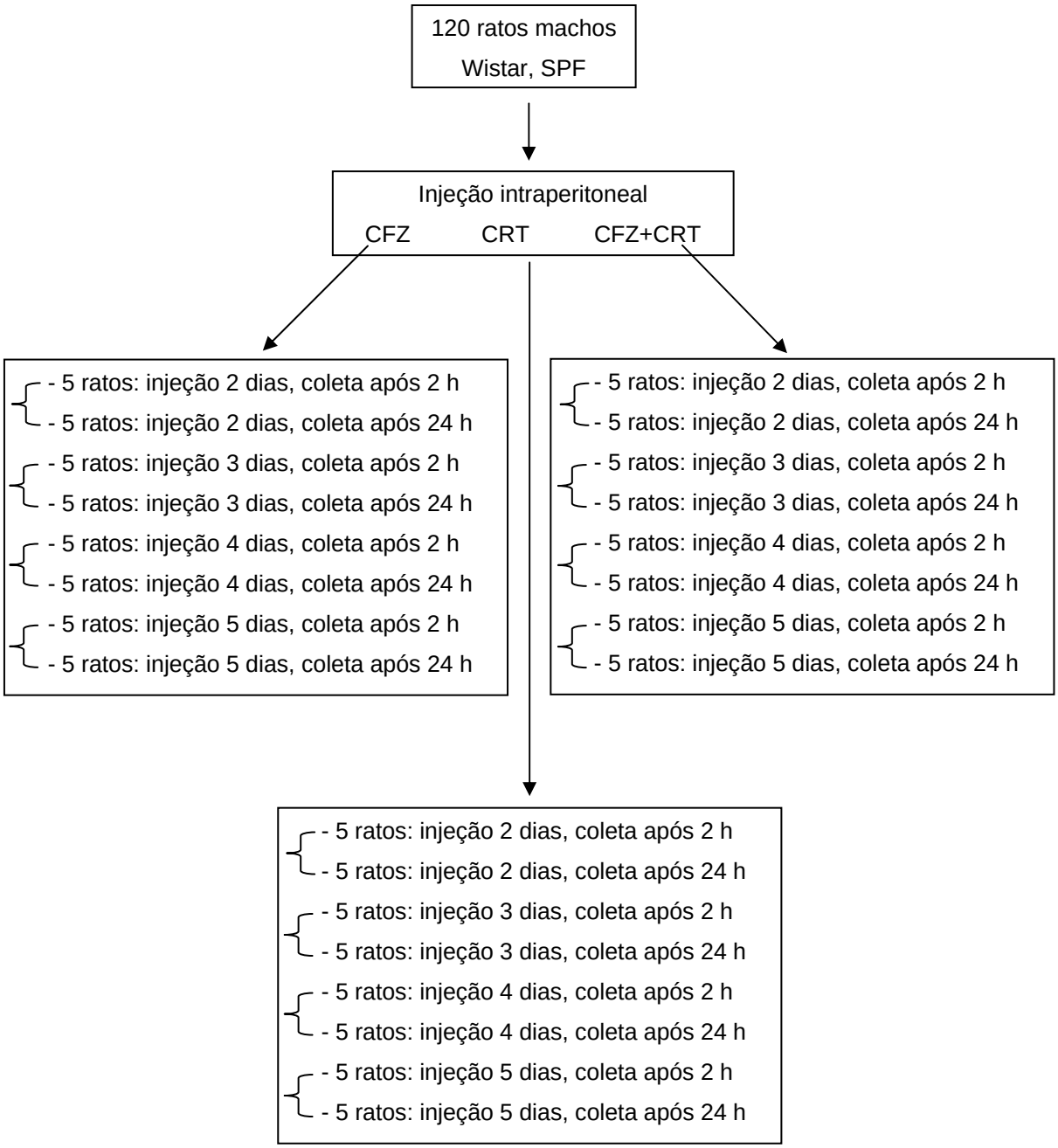

Figura 8. Piloto das concentrações plasmáticas dos fármacos

* Para a coleta das amostras neste piloto, foi administrada, intraperitonealmente, uma associação de ketamina 84 mg/kg com xilazina 9 mg/kg nos animais. Estas concentrações foram estabelecidas no piloto apresentado no item 3.1.5 e esquematizado na Figura 9.

3.1.5 Colheita de material

Foram colhidos aproximadamente 7 mL de sangue, por punção cardíaca, que foram assim distribuídos: 0,5 mL em tubo contendo 5 µL de uma solução aquosa de etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA Na_2) a 10%; 1,35 mL em tubo cônico graduado contendo 150 µL de uma solução aquosa de citrato de sódio dihidratado 3,8g%; 5 mL divididos em 2 tubos com 2 mL cada um contendo 20 µL (20U) de heparina e um tubo com 1mL contendo 8 µL de heparina.

Para a colheita de sangue, os ratos foram anestesiados com ketamina e xilazina. A melhor dosagem dos anestésicos, eficiente para o efeito anestésico e que não provocasse alterações nos leucócitos, foi definida em um estudo piloto, conforme descrito no item 3.1.5. Em regime de dose única, a colheita foi realizada 2 h após a administração dos fármacos. Em regime de dose múltipla, a coleta foi realizada conforme os resultados do estudo piloto de dose múltipla, descrito no item 3.1.3.3. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após a colheita do material.

A obtenção dos plasmas foi realizada centrifugando as amostras heparinizadas e citratadas, a 1600 x g, 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 armazenadas a -20°C. As análises dos parâmetros bioquímicos foram realizadas após no máximo três dias do armazenamento e a determinação das concentrações plasmáticas dos fármacos, em um período não superior a 15 dias. As análises hematológicas foram feitas no mesmo dia da colheita do material.

3.1.6 Ensaio piloto de anestésicos

Os ensaios realizados para a determinação das concentrações dos anestésicos estão descritos neste item e esquematizados na Figura 9.

Inicialmente, foram utilizados nos experimentos animais provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Foi realizado um estudo piloto para determinar a dose e o tempo de ação dos anestésicos ketamina e xilazina a serem utilizados nos experimentos. Como um dos objetivos deste estudo foi avaliar a quantidade e a função de neutrófilos, isto foi necessário para garantir que os anestésicos não provocassem alterações na mobilização de leucócitos.

Na primeira etapa, uma mistura de ketamina e xilazina foi administrada em 10 ratos machos Wistar. As concentrações variaram de 50 a 100 mg/kg para ketamina e de 5 a 10 mg/kg para xilazina, até se obter a concentração mínima possível de cada anestésico necessária para manter o animal anestesiado por pelo menos 5 minutos, tempo suficiente para a coleta de sangue. Numa segunda etapa, foram determinadas as contagens globais e específicas de leucócitos em sangue total anticoagulado com EDTA após administração de DMSO, CFZ e CRT em 40 ratos machos Wistar anestesiados, para verificação de alterações leucocitárias quantitativas (Figura 9).

Entretanto, após observação de algumas alterações físicas nos ratos provenientes do Biotério Central do Campus, optou-se por repetir os experimentos e utilizar, a partir daí, e em todos os experimentos do projeto, animais controlados (SPF – livres de patógenos específicos), para garantir maior confiabilidade dos resultados. Nesta terceira etapa, foram utilizados 15 ratos machos Wistar SPF, provenientes do Biotério II da FCFRP da USP, e repetido o mesmo procedimento, ou seja, administração de DMSO, CFZ e CRT nos animais e coleta após 2 horas da injeção, utilizando a associação dos anestésicos nas concentrações padronizadas na primeira etapa do experimento. Em seguida, foram realizadas as contagens globais e específicas dos leucócitos (Figura 9).

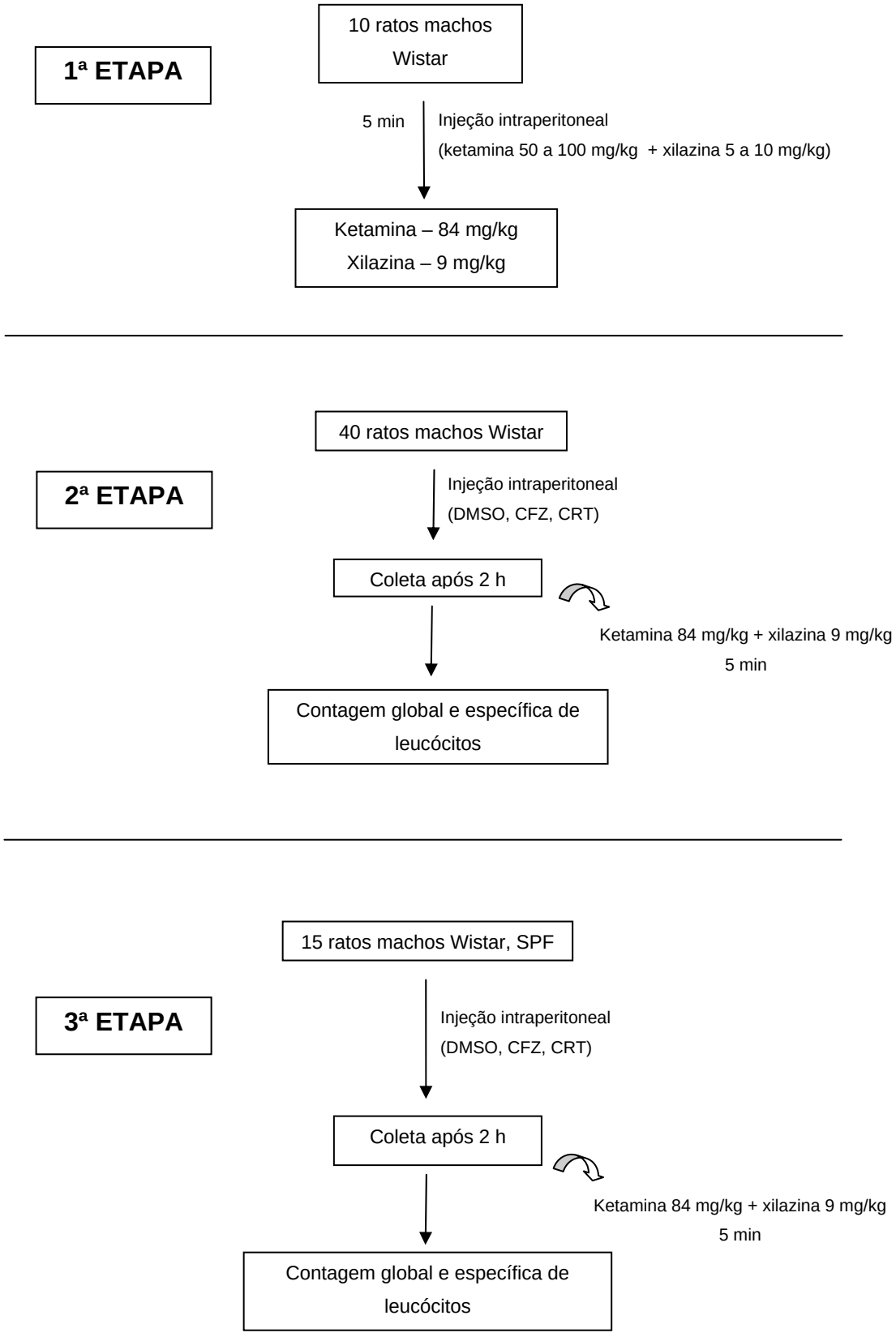

Figura 9. Fluxogramas dos pilotos dos anestésicos

3.2 MÉTODOS

Para melhor compreensão do desenvolvimento da pesquisa, apresentamos um fluxograma onde está demonstrado como as análises foram conduzidas (Figura 10).

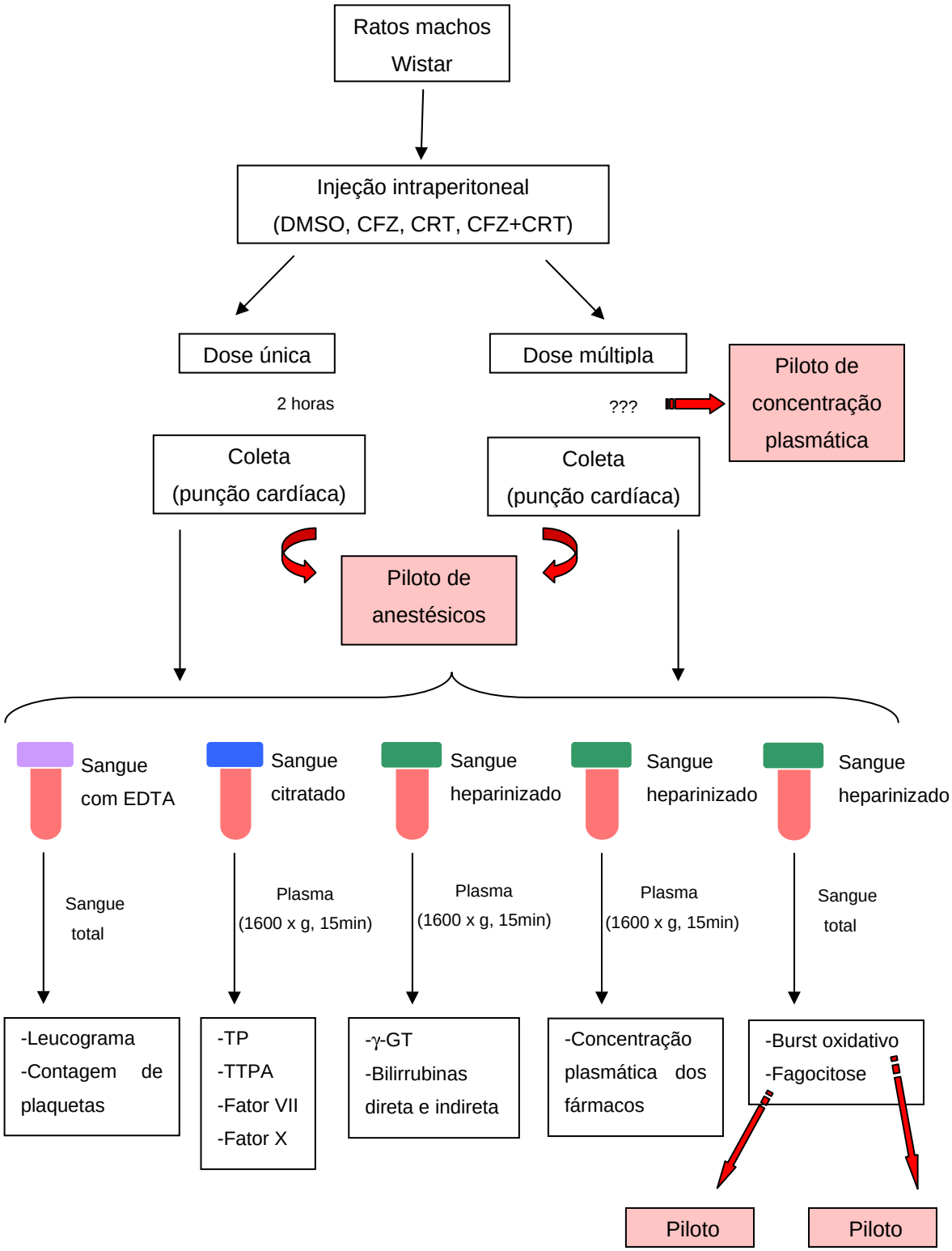

Figura 10. Fluxograma geral da metodologia

3.2.1 Métodos Analíticos

A determinação das concentrações plasmáticas dos fármacos, em plasma obtido de sangue anticoagulado com heparina, por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), esteve a cargo da Prof. Dra. Regina Helena Costa Queiroz, docente das disciplinas de Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP e colaboradora do projeto.

Para determinação das concentrações plasmáticas da clofazimina, foi construída uma curva de calibração nas concentrações de 25, 50, 100 e 250 ng/mL. Clofazimina foi extraída de 500 µL de plasma por adição de 1 mL de tampão acetato 0,25 M pH 4,4 e 5 mL de diclorometano e ressuspensa na fase móvel, constituída de 74 mL de metanol e 26 mL de tampão acetato 0,25 M pH 4,4. A mistura foi injetada em coluna RP 8, com fluxo condicionado em 1 mL/min e comprimento de onda de 254 nm.

Para determinação das concentrações plasmáticas da claritromicina, foi construída uma curva de calibração nas concentrações de 2,5, 5,0, 10,0 e 15,0 µg/mL. Claritromicina foi extraída de 500 µL de plasma por adição de 1 mL de tampão acetato 0,25 M pH 4,4 e 5 mL de diclorometano e ressuspensa na fase móvel, constituída de 55 mL de metanol, 5 mL de acetonitrila, 10 mL de isopropanol e 30 mL de tampão acetato 0,25 M pH 4,4. A mistura foi injetada em coluna RP 18, com fluxo condicionado em 1 mL/min e comprimento de onda de 285 nm.

3.2.2 Parâmetros Hematológicos

Amostras de sangue anticoaguladas com EDTA (a e b) e heparina (c e d) foram utilizadas na determinação dos seguintes parâmetros hematológicos:

a) Contagem global de leucócitos: 20 µL de sangue diluído em 0,38 mL de líquido de Turk, na proporção de 1:20. Os leucócitos foram contados em câmara de Neubauer, em microscópio óptico (COATES; MAEDEL, 1995);
b) Contagem diferencial de leucócitos: foram contadas 100 células em extensão sanguínea corada com May-Grünwald/Giemsa, em microscopia ótica, para estabelecer as proporções relativas e os números absolutos de cada tipo de leucócito (COATES; MAEDEL, 1995);

c) Avaliação do *burst* oxidativo de leucócitos: avaliação das espécies reativas de oxigênio produzidas pelos neutrófilos, em sangue total heparinizado, por citometria de fluxo, utilizando o citômetro BD FACSCanto, software FACSCan Diva (Becton Dickinson, San Jose, USA). A técnica, padronizada por nós, baseando-se em Richardson et al. (1998), está descrita no item 3.2.2.1;

d) Avaliação da fagocitose dos neutrófilos: realizada em sangue total heparinizado, por citometria de fluxo, utilizando o citômetro BD FACSCanto, software FACSCan Diva (Becton Dickinson, San Jose, USA). A técnica, padronizada por nós, está descrita no item 3.2.2.2.

3.2.2.1 Ensaio do *burst* oxidativo de neutrófilos

Reagentes:

- Solução estoque de dihidrorodamina (DHR) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA): 1 mg DHR em 1 mL de DMSO, estocado em alíquotas de 40 µL a -80ºC. Antes da análise, 20 µL foram dissolvidos em 650 µL de tampão de fosfato/salina (PBS), para dar uma solução de trabalho de 30 µg/mL.

- PMA e fMLP, ambos do kit *Burst Test* (ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Germany): solução de trabalho a 8,1 µM, diluído em PBS.

Ensaio:

O ensaio do *burst* oxidativo de neutrófilos foi realizado utilizando-se ratos SPF. Para a realização do teste, a 100 µL de sangue total colhido com heparina foram adicionados 25 µL de PMA 8,1 µM (tubo estimulado), 25 µL de fMLP 8,1 µM (tubo estimulado) ou 25 µL de PBS aos tubos branco e sem estímulo. Todos os tubos foram incubados a 37ºC por 15

minutos. Após este tempo, 25 µL de DHR foram adicionados aos tubos estimulados e sem estímulo, e 25 µL de PBS ao tubo branco. Todos os tubos foram incubados a 37ºC por 5 minutos. Para a lise das hemácias, 1 mL de solução de lise (BD FACS™ *Lysing Solution*, Becton Dickinson) foi adicionado a todos os tubos por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, acrescentou-se 1 mL de PBS aos tubos. As células foram lavadas por duas vezes e ressuspensas com 1 mL de paraformaldeído 1% em PBS. Foi realizada a leitura no citômetro de fluxo utilizando luz de excitação azul-verde (488 nm, laser íon argônio), coletando-se 10000 eventos por amostra.

3.2.2.2 Ensaio de fagocitose de neutrófilos

Preparo das bactérias:

As bactérias *Escherichia coli* cepa DH 10B foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini, docente do departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP - USP. Foi preparada uma suspensão de *E. coli* a partir de cultura fresca de 24 h em PBS, de acordo com a escala 2 de Mac Farland. A suspensão foi centrifugada a 400 x g por 15 minutos e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de solução de FITC - isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a 0,5 mg/mL em PBS. O *pellet* ressuspenso em FITC foi incubado a 37ºC por uma hora e em seguida lavado com PBS até que o sobrenadante ficasse incolor, sendo ressuspenso ao final em PBS.

Ensaio:

O ensaio foi realizado utilizando-se ratos SPF. Foram pipetados 100 µL de sangue total heparinizado em tubos de citometria (1 tubo teste e 1 tubo controle), no banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 100 µL da suspensão de *E. coli* marcada com FITC e misturou-se

em *vortex* suavemente. Os tubos teste foram incubados a 37ºC por 10 minutos e as amostras controle permaneceram no gelo. Após o tempo de incubação, os tubos teste voltaram para o banho de gelo e foram adicionados 100 µL da solução *quenching* (azul de tripan 4 mg/mL em tampão citrato de sódio 0,02 M) em cada amostra e em seguida 500 µL de formaldeído 1%. As amostras foram lavadas com 3 mL de PBS e centrifugadas a 250 x g, por 5 min a 4ºC. Em seguida, o sangue foi lisado com 1 mL de solução de lise (BD FACS™ *Lysing Solution*, Becton Dickinson) por 10 minutos à temperatura ambiente e as amostras lavadas após este tempo com 3 mL de PBS e centrifugadas a 250 x g, por 5 min a 4ºC. A suspensão foi ressuspensa em 500 µL de PBS e submetida à leitura no citômetro de fluxo utilizando luz de excitação azul-verde (488 nm, laser íon argônio), coletando-se 10000 eventos por amostra.

A viabilidade celular foi avaliada em tubo com sangue total submetido a todos os passos do procedimento anterior, porém utilizando apenas PBS. A leitura no citômetro foi realizada antes e após a adição de PI (iodeto de propídeo), a uma concentração final de 16,6 µg/mL.

3.2.3 Parâmetros Hemostáticos

a) Contagem de plaquetas: 20 µL 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 (Quick, 1938) utilizando kit comercial da marca Wiener (Wiener Lab., Santa Fé, Argentina) e aparelho Start – Bayer (Diagnostica Stago, Paris, France).

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 (Wiener Lab., Santa Fé, Argentina) e aparelho Start – Bayer (Diagnostica Stago, Paris, France).

d) Avaliação dos fatores VII e X da coagulação sangüínea, em plasma citratado, utilizando o aparelho Start – Bayer e kit comercial da Stago (Diagnostica Stago, Paris, France).

3.2.4 Parâmetros bioquímicos

A avaliação do perfil hepático foi realizada com plasma obtido por sangue anticoagulado com heparina, por meio da determinação dos seguintes parâmetros:

a) Gama-glutamiltransferase (γ-GT), por método cinético colorimétrico. A γ-GT catalisa a transferência do grupamento glutamil da γ-glutamil-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);

b) Bilirrubinas direta e total, por método colorimétrico, de acordo com Sims e Horn (1958). A bilirrubina reage com o diazo-reagente na presença de um acelerador (benzoato e cafeína tamponada). 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.

Ambas as determinações foram realizadas utilizando o espectrofotômetro digital Micronal B342II (Micronal, São Paulo, Brasil) e kits comerciais da marca Labtest (Labtest Diagnóstica, MG, Brasil).

3.2.5 Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada com auxílio do programa *GraphPad Prism®* versão 5.0, utilizando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns, o teste não paramétrico de Mann-Whitney e os testes paramétricos t não pareado e Análise de Variância, seguido do pós-teste de Tukey. O nível de significância estabelecido foi $p<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Pilotos

4.1.1 Concentração plasmática dos fármacos: estabelecimento do regime de doses múltiplas

No estudo de Paina, Queiroz e Souza (2008), verificou-se efeitos adversos causados pela claritromicina como aumento da contagem de leucócitos, de células mononucleares e dos níveis plasmáticos de gama-glutamiltransferase. Clofazimina e claritromicina ocasionaram aumento do número de células polimorfonucleares e prolongamento dos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada. Estes efeitos foram verificados quando os fármacos foram administrados em monoterapia, a cada 24 horas, durante 04 dias consecutivos, sendo a coleta do material biológico realizada após 24 horas da última dose. Utilizamos este regime de tratamento para estabelecer o melhor esquema terapêutico para este trabalho, administrando os fármacos em mono e politerapia a cada 24 horas durante 2, 3, 4 ou 5 dias e realizando a coleta após 2 ou 24 horas da última dose, conforme o item 3.1.3.3.1 da metodologia.

Não foram observadas alterações estatisticamente significantes entre as concentrações plasmáticas nos diferentes esquemas de tratamento dos fármacos administrados em monoterapia e em politerapia (dados não mostrados).

4.1.2 Ensaio piloto de anestésicos

As concentrações de ketamina e xilazina suficientes para anestesiar os animais durante, pelo menos, 5 minutos foram 84 mg/kg e 9 mg/kg, respectivamente. As contagens globais e específicas de leucócitos em ratos anestesiados com os anestésicos nestas concentrações estão representadas nas figuras 11 a 16 e foram comparadas com os resultados obtidos por Paina, Queiroz e Souza (2008), cujo anestésico utilizado, éter etílico, não causou

alterações leucocitárias nos animais. Este ensaio foi realizado com ratos não SPF, provenientes do Biotério Central, e com ratos SPF, provenientes do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ratos não SPF

Foram utilizados 40 animais, divididos em 03 grupos: controle DMSO e tratados com clofazimina e claritromicina, em regime de dose única, ambos na dose de 100 mg/kg. As figuras 11 e 12 apresentam o número de leucócitos em ratos tratados com clofazimina e claritromicina, respectivamente, quando comparados ao controle DMSO, sendo A o estudo realizado com ketamina e xilazina e B o estudo de Paina, Queiroz e Souza (2008), realizado com éter. As figuras 13 e 14 mostram o número de células mononucleares e as figuras 15 e 16 o número de células polimorfonucleares em ratos tratados com clofazimina e claritromicina em ambos os estudos. Foi observado aumento do número de leucócitos totais (Figuras 11 e 12), de células mononucleares (Figuras 13 e 14) e de polimorfonucleares (Figuras 15 e 16) no estudo com ketamina e xilazina (A) em relação ao estudo de Paina, Queiroz e Souza (2008), com éter (B).

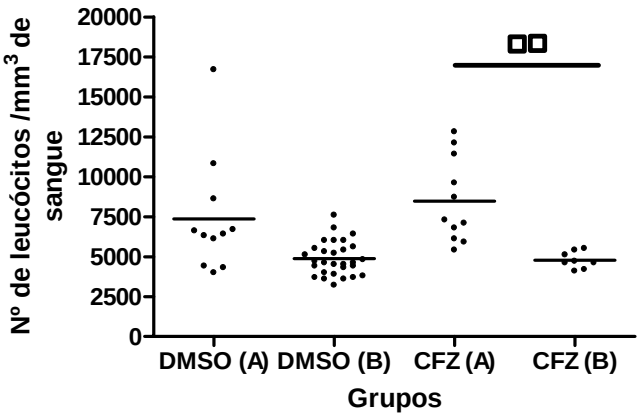

Figura 11. Número de leucócitos em ratos tratados com DMSO e clofazimina em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso, no estudo com ketamina e xilazina (A) e no estudo com éter (B). As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, □□ p<0,01

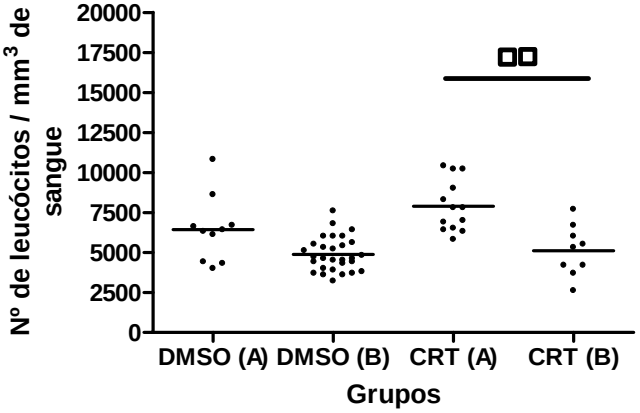

Figura 12. Número de leucócitos em ratos tratados com DMSO e claritromicina em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso, no estudo com ketamina e xilazina (A) e no estudo com éter (B). As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, □□ p<0,01

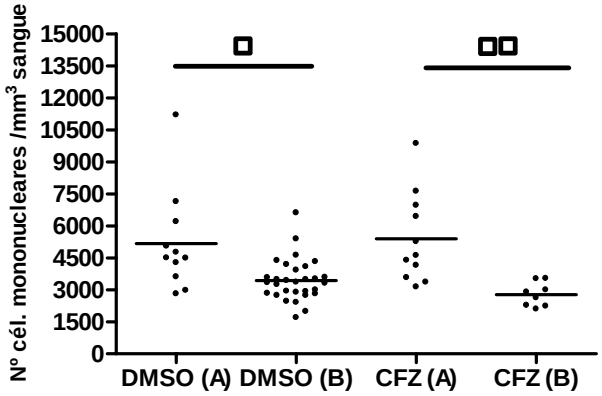

Figura 13. Número de células mononucleares em ratos tratados com DMSO e clofazimina em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso, no estudo com ketamina e xilazina (A) e no estudo com éter (B). As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, □ p<0,05; □□ p<0,01

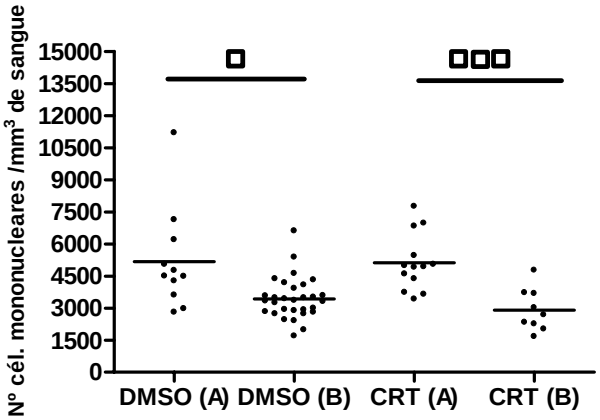

Figura 14. Número de células mononucleares em ratos tratados com DMSO e claritromicina em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso, no estudo com ketamina e xilazina (A) e no estudo com éter (B). As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, □ p<0,05; □□□ p <0,001.

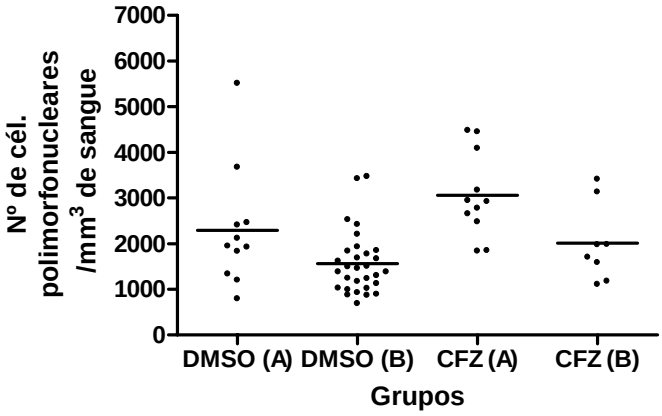

Figura 15. Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com DMSO e clofazimina em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso, no estudo com ketamina e xilazina (A) e no estudo com éter (B). As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05

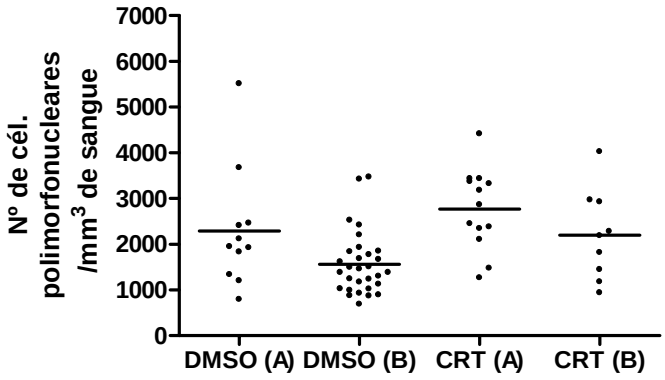

Figura 16. Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com DMSO e claritromicina, em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso, no estudo com ketamina e xilazina (A) e no estudo com éter (B). As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05

Ratos SPF

Foram utilizados 05 animais SPF em cada grupo (controle DMSO e tratados com clofazimina e claritromicina). O número de leucócitos totais, células mononucleares e polimorfonucleares deste estudo (A), comparados com o estudo de pesquisa realizada com éter (B), estão apresentados nas figuras 17 a 22. Observa-se que não há diferença entre as medianas dos grupos tratados com DMSO e com os fármacos nos dois estudos.

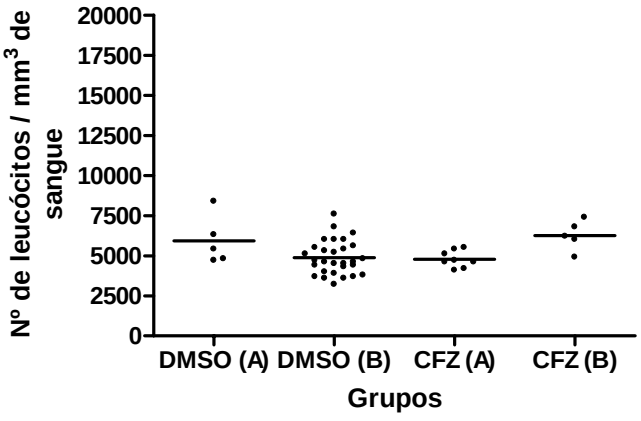

Figura 17. Número de leucócitos em ratos tratados com DMSO e clofazimina em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso, no estudo com ketamina e xilazina (A) e no estudo com éter (B). As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05

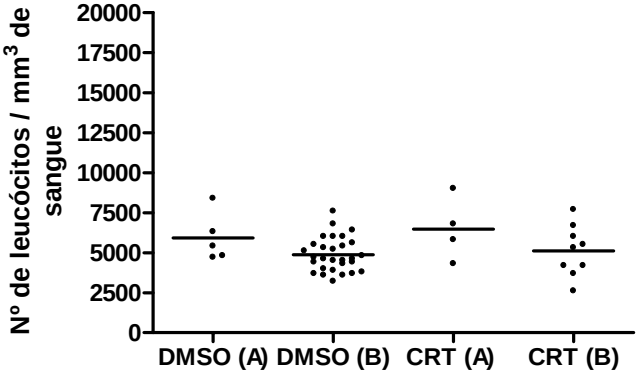

Figura 18. Número de leucócitos em ratos tratados com DMSO e claritromicina em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso, no estudo com ketamina e xilazina (A) e no estudo com éter (B). As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05

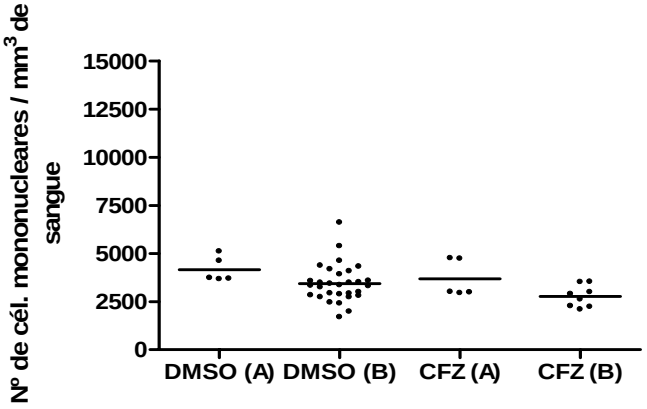

Figura 19. Número de células mononucleares em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso, no estudo com ketamina e xilazina (A) e no estudo com éter (B). As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05

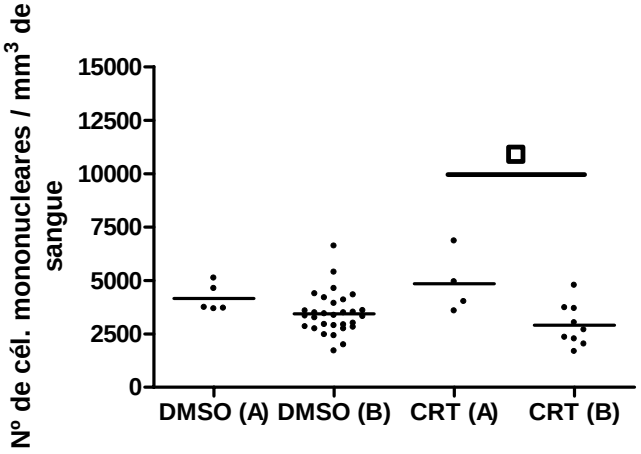

Figura 20. Número de células mononucleares em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso, no estudo com ketamina e xilazina (A) e no estudo com éter (B). As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, □ $p<0,05$

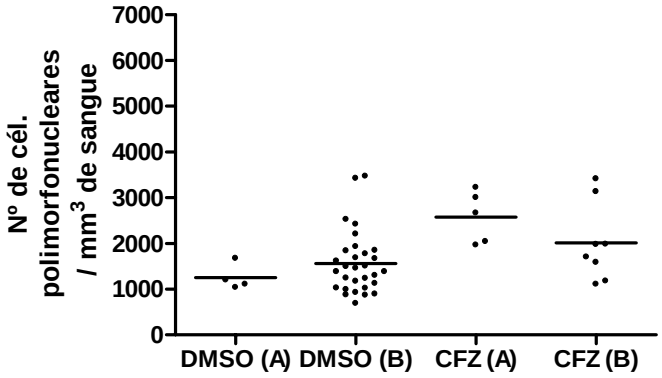

Figura 21. Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com clofazimina em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso, no estudo com ketamina e xilazina (A) e no estudo com éter (B). As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, $p>0,05$

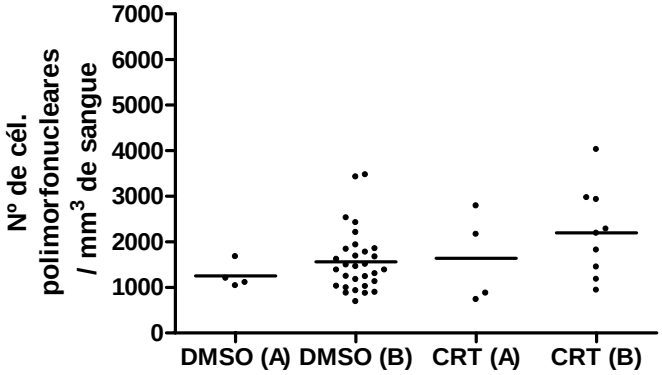

Figura 22. Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com claritromicina em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso, no estudo com ketamina e xilazina (A) e no estudo com éter (B). As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05

4.2 Experimentos

4.2.1 Variação de peso dos animais em regime de dose múltipla

Os valores destas pesagens foram submetidos à análise, visto que tanto clofazimina como claritromicina podem ocasionar efeitos adversos no trato gastrointestinal, que poderia comprometer o ganho de peso dos animais. Os resultados das análises estão representados nas tabelas 1 a 5 e figura 23. Os resultados representam os pesos dos animais após os 4 dias do seguimento, tendo sido realizadas duas pesagens ao dia, uma antes de cada dose administrada.

Pela Análise de Variância, foi possível inferir que houve significância estatística (p<0,0001) tanto em relação ao tempo como ao tipo de tratamento. Observou-se que os ratos tratados com os fármacos, em monoterapia e politerapia, apresentaram perda de peso no decorrer dos dias de tratamento em relação ao controle DMSO (Tabelas 1 a 5; Figura 23). Ratos tratados com DMSO praticamente não perderam peso ao final do tratamento, ao passo que os tratados com clofazimina perderam em média 8 % do seu peso corporal, enquanto os que receberam claritromicina e a associação dos fármacos tiveram perda de aproximadamente 18 % do peso total corporal.

Tabela 1: Pesos (gramas) de ratos tratados com dimetilsulfóxido (DMSO), clofazimina (CFZ), claritromicina (CRT) e com a politerapia (CFZ + CRT), na dose de 100mg/kg de peso, no primeiro dia do esquema de dose múltipla

DMSO	**CFZ**	**CRT**	**CFZ + CRT**
(n = 16)	**(n = 16)**	**(n = 18)**	**(n = 19)**
240	230	275	247
275	246	222	245
274	246	287	232
247	264	220	279
258	260	259	280
264	240	243	258
271	273	283	242
256	236	267	265
229	238	247	242
256	265	245	236
272	255	247	251
254	258	259	254
250	254	259	261
236	254	254	254
279	284	241	250
290	275	261	272
		274	255
		290	260
			285
259 ± 17 *	**255 ± 15***	**257 ± 20***	**256 ± 15***

média ± desvio padrão

Tabela 2: Pesos (gramas) de ratos tratados com dimetilsulfóxido (DMSO), clofazimina (CFZ), claritromicina (CRT) e com politerapia (CFZ + CRT), na dose de 100mg/kg de peso, no segundo dia do esquema de dose múltipla

DMSO	**CFZ**	**CRT**	**CFZ + CRT**
(n = 16)	**(n = 16)**	**(n = 18)**	**(n = 19)**
237	218	241	224
245	226	235	248
282	245	228	228
248	229	216	226
250	222	230	216
267	234	263	256
272	268	258	259
262	211	248	247
228	230	221	223
259	270	223	214
275	232	248	234
257	245	236	240
246	243	253	241
235	239	233	234
277	267	221	227
280	262	242	249
		257	232
		269	238
			268
258 ± 17*	**240 ± 18***	**240 ± 16***	**237 ± 15***

*****_média ± desvio padrão_

Tabela 3: Pesos (gramas) de ratos tratados com dimetilsulfóxido (DMSO), clofazimina (CFZ), claritromicina (CRT) e com a politerapia (CFZ + CRT), na dose de 100mg/kg de peso, no terceiro dia do esquema de dose múltipla

DMSO	**CFZ**	**CRT**	**CFZ + CRT**
(n = 16)	**(n = 16)**	**(n = 18)**	**(n = 19)**
257	196	201	202
242	210	200	217
278	222	225	210
244	219	190	199
248	213	209	206
271	230	258	243
264	258	243	246
263	208	241	232
219	222	211	209
254	261	216	204
270	228	234	220
254	240	224	225
252	239	232	231
234	244	225	222
268	263	215	212
265	253	231	237
		244	218
		260	224
			256
255 ± 15*	**232 ± 20***	**226 ± 20***	**222 ± 16***

*****média ± desvio padrão*

Tabela 4: Pesos (gramas) de ratos tratados com dimetilsulfóxido (DMSO), clofazimina (CFZ), claritromicina (CRT) e com a politerapia (CFZ + CRT), na dose de 100mg/kg de peso, no quarto dia do esquema de dose múltipla

DMSO	**CFZ**	**CRT**	**CFZ + CRT**
(n = 16)	**(n = 16)**	**(n = 18)**	**(n = 19)**
240	180	183	180
220	214	190	215
274	219	200	196
254	225	186	189
253	216	197	201
271	230	246	235
267	258	242	238
252	214	228	229
218	226	205	206
251	248	204	200
268	229	228	211
261	238	222	212
250	239	228	223
243	247	215	215
273	266	204	210
264	258	224	234
		231	215
		253	218
			245
254 ± 17*	**232 ± 22***	**216 ± 21***	**214 ± 17***

*****média ± desvio padrão*

Tabela 5: Pesos (gramas) de ratos tratados com dimetilsulfóxido (DMSO), clofazimina (CFZ), claritromicina (CRT) e com a politerapia (CFZ + CRT), na dose de 100mg/kg de peso, no quinto dia do esquema de dose múltipla

DMSO	**CFZ**	**CRT**	**CFZ + CRT**
(n = 16)	**(n = 16)**	**(n = 18)**	**(n = 19)**
224	203	180	210
226	200	187	200
275	220	190	192
258	226	190	188
257	220	191	191
267	231	235	230
270	260	240	239
255	219	220	223
227	228	202	200
241	245	195	202
267	228	227	207
252	232	211	206
251	242	220	213
245	257	213	205
276	268	193	199
266	261	215	224
		231	210
		247	215
			238
254 ± 17*	**234 ± 20***	**210 ± 20***	**210 ± 15***

******média ± desvio padrão*

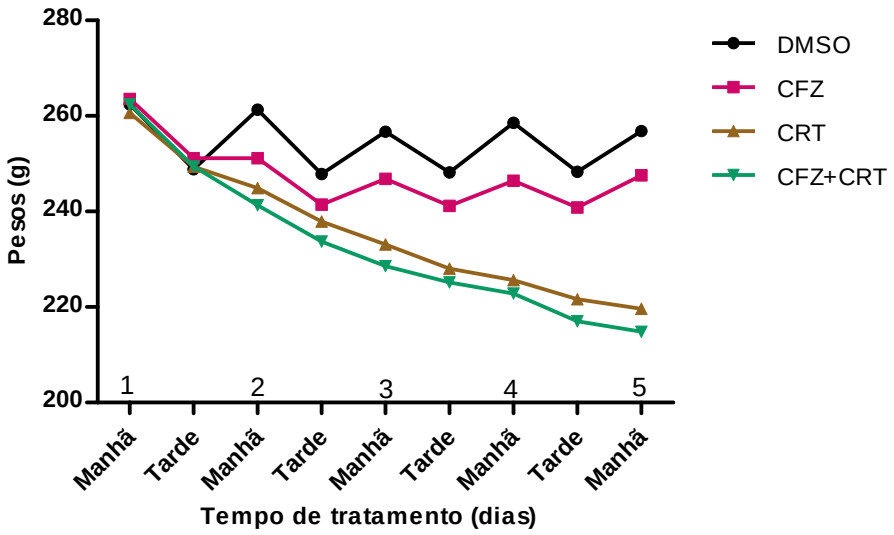

Figura 23. Médias dos pesos de ratos tratados com clofazimina, claritromicina e com a politerapia em regime de dose múltipla, na dose de 100 mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO.

4.2.2 Concentração plasmática dos fármacos

Clofazimina e claritromicina foram administradas em monoterapia e em politerapia com clofazimina, em regime de doses única e múltipla, seguindo os esquemas de dosagem previamente propostos.

Relação entre dose e concentração plasmática de claritromicina

A tabela 6 e a figura 24 mostram os resultados das concentrações plasmáticas de claritromicina administrada em mono ou politerapia. Os fármacos foram administrados na dose de 100 mg/kg de peso, em regime de dose única.

Não foram observadas alterações estatisticamente significantes entre as concentrações plasmáticas de claritromicina, administrada em monoterapia ou politerapia.

Tabela 6: Concentrações plasmáticas de claritromicina (µg/mL), administrada no esquema de dose única, em monoterapia ou politerapia com clofazimina, na dose de 100mg/kg de peso

Animal	CRT	Animal	CRT + CFZ
1	6,33	**8**	5,33
2	5,98	**9**	5,42
3	5,13	**10**	5,16
4	6,90	**11**	6,28
5	5,65	**12**	5,82
6	5,32	**13**	4,73
7	6,11	**14**	6,55
Média ± sd	5,92 ± 0,61	**Média ± sd**	5,62 ± 0,64

sd = desvio padrão

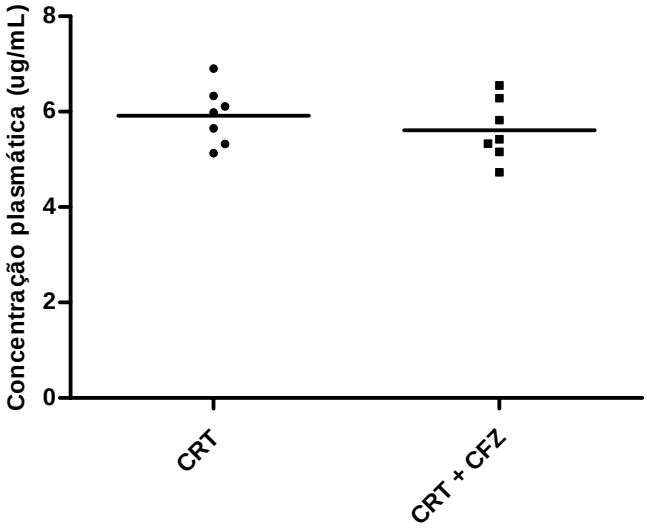

Figura 24. Concentrações plasmáticas de claritromicina em monoterapia ou politerapia com clofazimina, em ratos tratados em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso para ambos os fármacos. As barras representam a média. Teste t não pareado, p>0,05

As concentrações plasmáticas de claritromicina administrada em monoterapia ou em politerapia estão representadas na tabela 7 e figura 25. Os fármacos foram administrados na dose de 100 mg/kg de peso, em regime de dose múltipla.

Não houve alterações significantes entre as concentrações plasmáticas de claritromicina administrada em mono ou politerapia.

Tabela 7: Concentrações plasmáticas de claritromicina (µg/mL), administrada no esquema de dose múltipla, em monoterapia ou politerapia com clofazimina, na dose de 100mg/kg de peso

Animal	CRT	Animal	CRT + CFZ
1	2,05	**09**	2,92
2	2,24	**10**	2,09
3	2,56	**11**	2,22
4	2,33	**12**	2,60
5	2,63	**13**	2,20
6	2,01	**14**	2,63
7	2,71	**15**	2,10
8	2,36	**16**	2,14
Média ± sd	2,36 ± 0,26	**Média ± sd**	2,36 ± 0,31

sd = desvio padrão

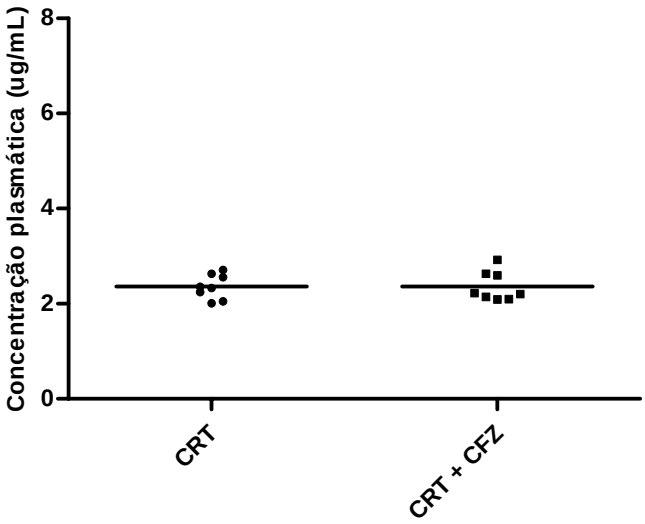

Figura 25. Concentrações plasmáticas de claritromicina em monoterapia ou politerapia com clofazimina, em ratos tratados em regime de dose múltipla, na dose de 100 mg/kg de peso para ambos os fármacos. As barras representam a média. Teste t não pareado, p>0,05

Apesar de não haver diferença estatística entre monoterapia e politerapia no mesmo regime de dosagem, há diferença significativa (Figura 26) quando se comparam as concentrações plasmáticas de claritromicina administrada em regime de dose única (CRT du) em relação à dose múltipla (CRT dm), tanto em monoterapia como associada à clofazimina (CRT + CFZ dm). Foi observada ainda diferença estatística entre claritromicina administrada em regime de dose múltipla (CRT dm) e associada à clofazimina em dose única (CRT + CFZ du) e na politerapia em doses única e múltipla (CRT + CFZ du e CRT + CFZ dm, respectivamente).

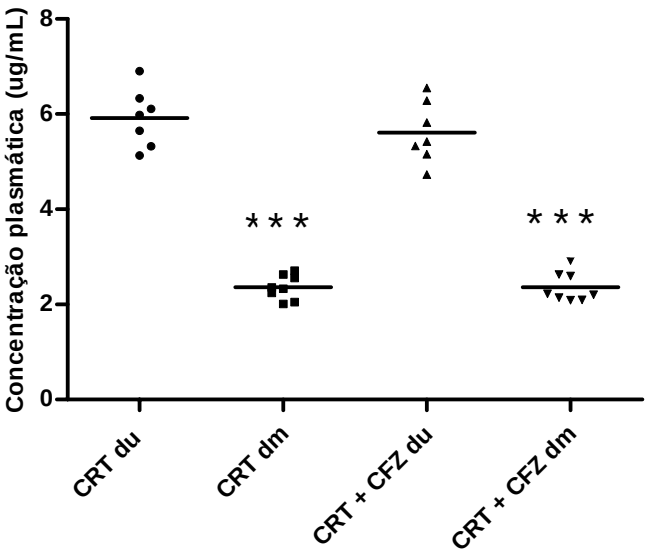

Figura 26. Concentrações plasmáticas de claritromicina em monoterapia ou politerapia com clofazimina, em ratos tratados em regime de doses única e múltipla, na dose de 100 mg/kg de peso para ambos os fármacos. As barras representam a média. Teste Análise de Variância, ***p < 0,0001 em relação a CRT du e CRT + CFZ du

Relação entre dose e concentração plasmática de clofazimina

Na tabela 8 e a figura 27 estão demonstrados os resultados das concentrações plasmáticas de clofazimina administrada em mono ou politerapia. Os fármacos foram administrados na dose de 100 mg/kg de peso, em regime de dose única. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações plasmáticas de clofazimina administrada em monoterapia ou politerapia.

As concentrações plasmáticas de clofazimina, administrada nas duas formas, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em regime de dose múltipla (Tabela 9 e Figura 28).

Tabela 8: Concentrações plasmáticas de clofazimina (ng/mL), administrada no esquema de dose única, em monoterapia ou politerapia com claritromicina, na dose de 100mg/kg de peso

Animal	CFZ	Animal	CFZ + CRT
1	128,9	**7**	126,4
2	125,9	**8**	130,4
3	124,6	**9**	135,7
4	132,9	**10**	129,8
5	126,0	**11**	124,6
6	125,4	**12**	122,6
		13	128,1
Média ± sd	127,3 ± 3,1	**Média ± sd**	128,2 ± 4,3

sd = desvio padrão

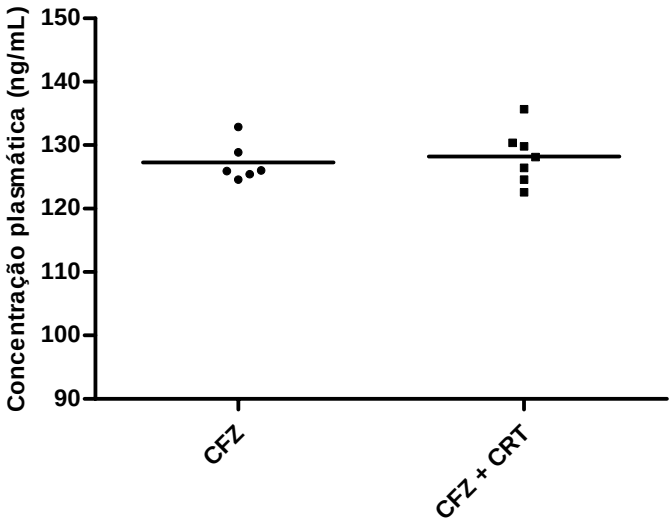

Figura 27. Concentrações plasmáticas de clofazimina em monoterapia ou politerapia com claritromicina, em ratos tratados em regime de dose única, na dose de 100 mg/kg de peso para ambos os fármacos. As barras representam a média. Teste t não pareado, p>0,05

Tabela 9: Concentrações plasmáticas de clofazimina (ng/mL), administrada no esquema de dose múltipla, em monoterapia ou politerapia com claritromicina, na dose de 100mg/kg de peso

Animal	CFZ	Animal	CFZ + CRT
1	100,4	**7**	105,4
2	109,6	**9**	103,3
3	104,1	**10**	101,0
4	103,4	**11**	106,1
5	103,8	**12**	102,0
6	106,8	**13**	108,5
		14	101,9
		15	108,5
Média ± sd	105,2 ± 3,2	**Média ± sd**	104,6 ± 3,0

sd = desvio padrão

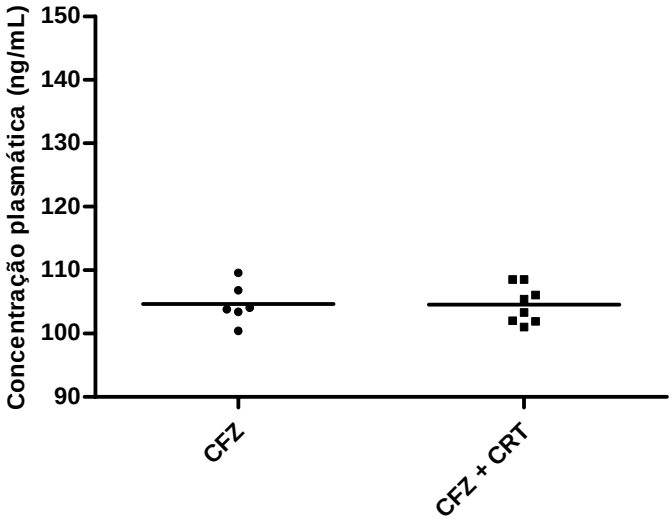

Figura 28. Concentrações plasmáticas de clofazimina em monoterapia ou politerapia com claritromicina, em ratos tratados em regime de dose múltipla, na dose de 100 mg/kg de peso para ambos os fármacos. As barras representam a média. Teste t não pareado, p>0,05

Apesar de não ter havido diferença estatística entre monoterapia e politerapia dentro do mesmo regime de dosagem, há diferença significativa quando se comparam as concentrações de dose única e dose múltipla, tanto em mono como em politerapia.

Observam-se diferenças estatisticamente significantes (Figura 29) entre as concentrações de clofazimina administrada em regime de dose única (CFZ du) quando comparadas ao fármaco administrado em dose múltipla em monoterapia (CFZ dm) ou associada à claritromicina (CFZ + CRT dm) bem como quando compara-se a clofazimina administrada em dose múltipla (CFZ dm) com o fármaco associado à clofazimina, em dose única (CFZ + CRT du).

Também houve diferença estatisticamente significante quando foram comparadas as concentrações plasmáticas das associações entre clofazimina e claritromicina em doses única e múltipla (CFZ + CRT du e CFZ + CRT dm, respectivamente).

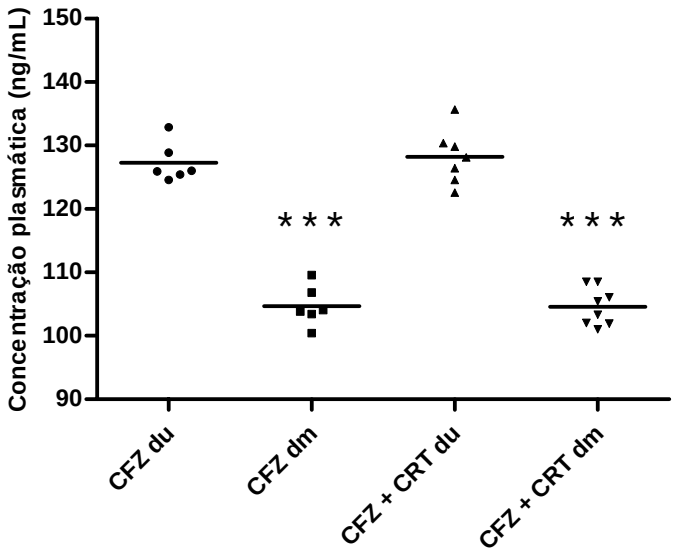

Figura 29. Concentrações plasmáticas de clofazimina em monoterapia ou politerapia com claritromicina, em ratos tratados em regime de doses única e múltipla, na dose de 100 mg/kg de peso para ambos os fármacos. As barras representam a média. Teste Análise de Variância, ***p < 0,0001 em relação a CFZ du e CFZ + CRT du

4.2.3 Parâmetros hematológicos

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

A figura 30 apresenta o número global de leucócitos dos ratos tratados com os fármacos e do controle DMSO. Pode-se observar que, em regime de dose única (Figura 30-A) não há diferença estatisticamente significante entre os grupos. Nas doses múltiplas (Figura 30-B), tanto animais tratados com claritromicina como com os fármacos em politerapia apresentaram número de leucócitos aumentado em relação ao grupo controle.

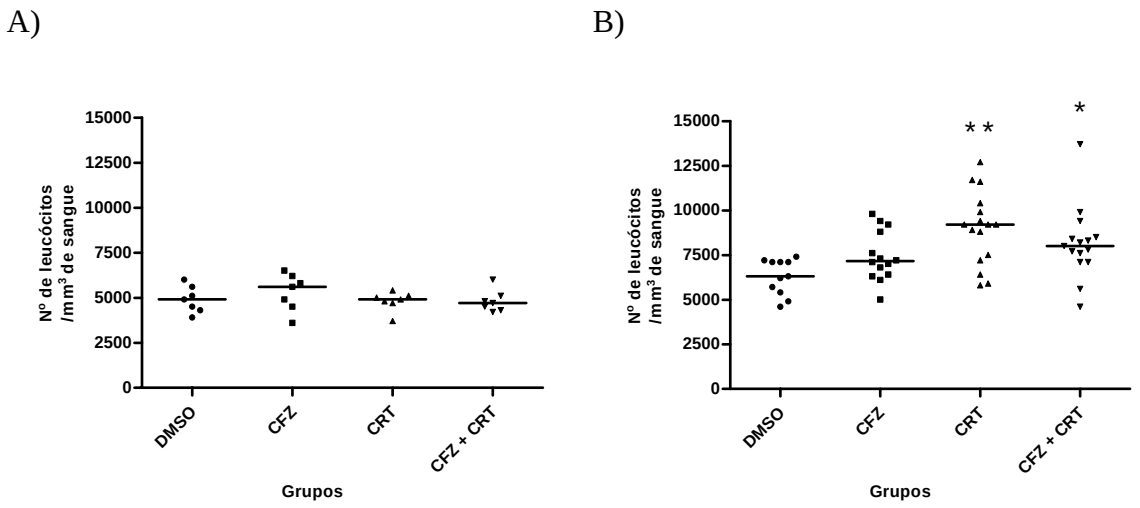

Figura 30. Número de leucócitos em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100 mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05 (A); *p<0,05 e **p<0,001 em relação a DMSO (B)

Houve redução do número de células mononucleares em ratos tratados com claritromicina em monoterapia ou em politerapia com clofazimina (Figura 31). Em regime de dose única, esta redução não foi estatisticamente significante, entretanto, em doses múltiplas, é possível observar significância estatística no grupo tratado com o esquema de politerapia (p<0,05).

Houve aumento do número de células polimorfonucleares em todos os regimes de dosagem em relação ao controle DMSO, conforme mostrado na figura 32.

Desta forma, parece que os fármacos são capazes de provocar inversão da proporção entre células mono e polimorfonucleares em relação ao grupo controle (Figuras 31 e 32) e, as alterações na politerapia CFZ + CRT, parecem ser provocadas pela claritromicina.

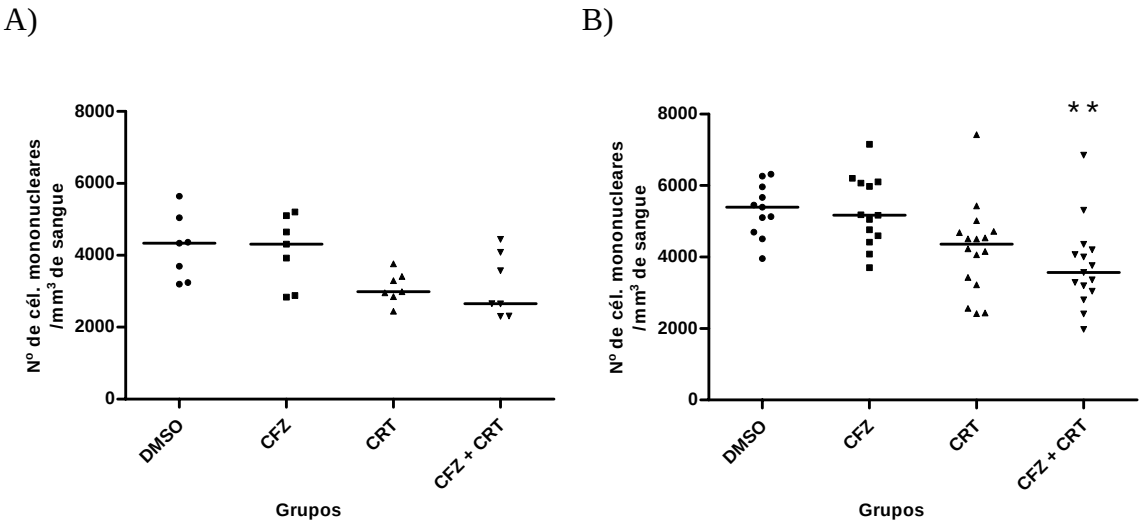

Figura 31. Número de células mononucleares em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100 mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p<0,05 (A); **p<0,001 em relação a DMSO e a CFZ (B)

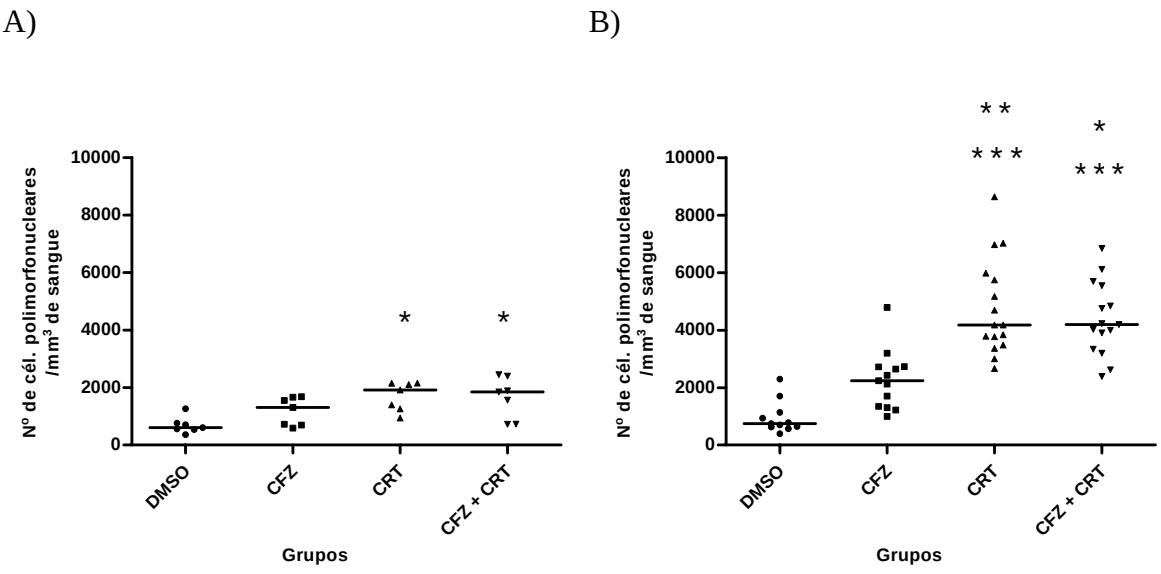

Figura 32. Número de células polimorfonucleares em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100 mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, *p<0,05 em relação a DMSO (A); **p<0,001 em relação a CFZ, ***p<0,0001 em relação a DMSO, *p<0,05 em relação a CFZ, ***p<0,0001 em relação a DMSO (B)

Efeitos da clofazimina, claritromicina e da politerapia sobre o burst oxidativo de neutrófilos

A figura 33-A mostra a distribuição das células sanguíneas de acordo com a dispersão de luz, quando uma amostra de sangue é analisada por citometria de fluxo. A dispersão de luz pelas células está relacionada ao seu tamanho e conteúdo celular ou complexidade interna.

A partir deste gráfico, foi selecionada a população de neutrófilos (*gate)* para avaliação da emissão de luz da sonda fluorescente incorporada às células, neste caso a dihidrorodamina (DHR). A medida da intensidade de fluorescência reflete a atividade do *burst* respiratório.

A figura 33-B mostra um exemplo de gráfico do tipo *dot plot* de complexidade interna (eixo X) versus fluorescência (eixo Y), originado a partir de uma *gate* de neutrófilos. Em vermelho, estão representados neutrófilos que não exibiram fluorescência e em verde, estão representados neutrófilos fluorescentes e, portanto, com atividade de *burst* oxidativo.

Os resultados do *burst* oxidativo, não estimulado e estimulado por PMA e fMLP, produzido pelos neutrófilos de ratos após administração do controle DMSO e dos fármacos em mono ou politerapia são apresentados na figura 34.

A) B)

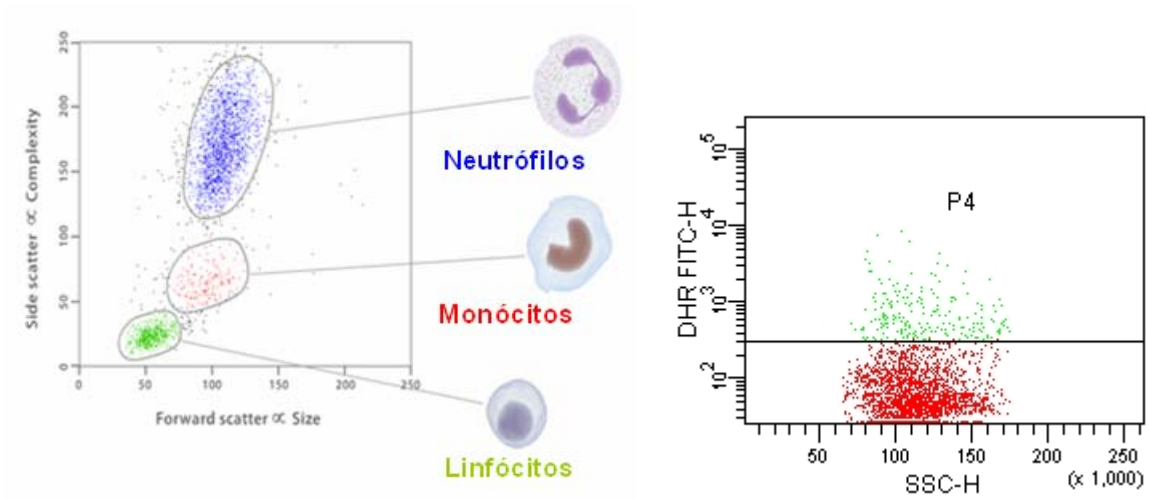

Figura 33. Esquema representativo de gráfico *dot-plot* obtido por citometria de fluxo em amostra de sangue de ratos. A) Tamanho versus complexidade interna. As *gates* representam as populações celulares derivadas de sangue; B) Complexidade interna versus intensidade de fluorescência. Em verde, neutrófilos positivos para *burst* oxidativo e, em vermelho, neutrófilos negativos para *burst* oxidativo.

A) B)

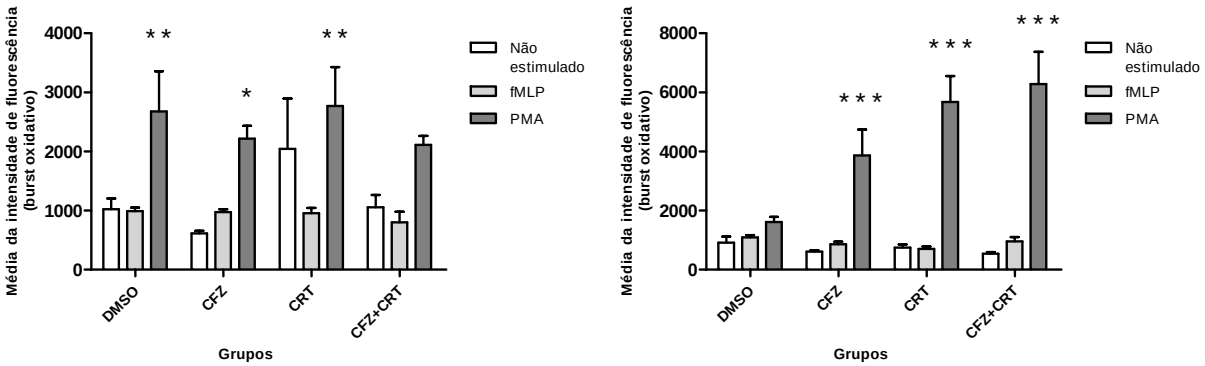

Figura 34. *Burst* oxidativo de neutrófilos de ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100 mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. Teste Análise de Variância. A) DMSO: **p<0,01 em relação ao não estimulado e fMLP; CFZ: *p<0,05 em relação ao não estimulado; CRT: **p<0,01 em relação a fMLP. B) CFZ: ***p<0,001 em relação ao não estimulado e fMLP; CRT: ***p<0,001 em relação ao não estimulado e fMLP; CFZ + CRT: ***p<0,001 em relação ao não estimulado e fMLP.

Em regime de dose única, o grupo controle DMSO apresentou aumento do *burst* oxidativo estimulado com PMA em relação aos grupos não estimulado e estimulado com fMLP. O grupo CFZ apresentou diferença estátistica somente em relação ao grupo não estimulado, enquanto o grupo CRT teve maior intensidade de fluorescência quando estimulado por PMA, em relação à fMLP. Todos os grupos apresentaram intensidades de fluorescência aumentadas quando estimulados com PMA, porém não houve diferença entre os tratamentos com os fármacos em relação ao controle DMSO (Figura 34-A).

Em regime de dose múltipla, o aumento da intensidade de fluorescência ficou bem caracterizado nos grupos tratados com clofazimina, claritromicina e na politerapia, nos grupos estimulados com PMA em relação aos não estimulados e estimulados com fMLP. Além disso, fica evidenciado pela significância estatística ($p < 0,0001$) da comparação entre os grupos CFZ, CRT e CFZ + CRT em relação ao controle DMSO, que os ratos que foram tratados com CFZ + CRT tiveram atividade de *burst* oxidativo maior em relação àqueles tratados respectivamente com claritromicina, clofazimina e DMSO (Figura 34-B).

A figura 35 mostra a porcentagem de neutrófilos positivos para o *burst* oxidativo dos animais tratados com o controle DMSO e com os fármacos. Houve aumento da porcentagem de células positivas em todos os grupos estudados, tanto controle como tratados, quando comparados ao grupo em que o *burst* foi estimulado com PMA em relação ao não estimulado (Figura 35-A). Nos grupos clofazimina e claritromicina, em monoterapia, há diferença estatística também em relação ao grupo em que o *burst* foi estimulado com fMLP, sendo observado que a maior significância estatística encontra-se no grupo em que foi administrada claritromicina em monoterapia. Todos os grupos apresentaram aumento da porcentagem de neutrófilos positivos, com a mesma significância estatística, no grupo em que o *burst* foi estimulado com PMA em relação aos não estimulados e estimulados com fMLP (Figura 35-B).

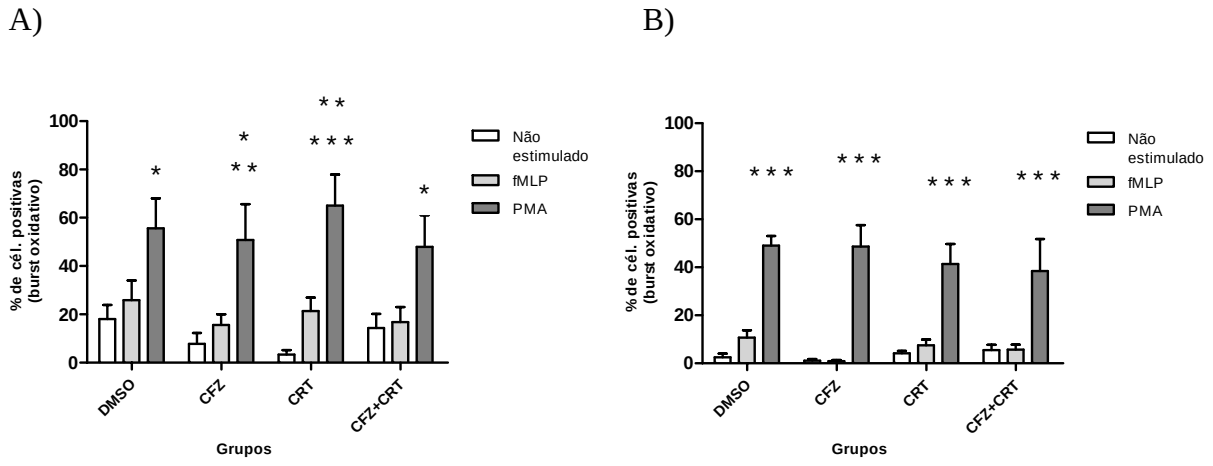

Figura 35. Porcentagem de neutrófilos positivos para o *burst* oxidativo de ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100 mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. Teste Análise de Variância. A) DMSO: *p<0,05 em relação ao não estimulado; CFZ: **p<0,01 em relação ao não estimulado e *p<0,05 em relação à fMLP; CRT: ***p<0,001 em relação ao não estimulado e **p<0,01 em relação a fMLP; CFZ + CRT: *p<0,05 em relação ao não estimulado. B) DMSO, CFZ, CRT e CFZ + CRT: ***p<0,001 em relação ao não estimulado e a fMLP

Efeitos da clofazimina, claritromicina e da politerapia sobre a fagocitose de neutrófilos

O ensaio de fagocitose foi realizado por citometria de fluxo. Foi selecionada a *gate* dos neutrófilos para avaliação da emissão de luz do composto fluorescente FITC ligado à bactéria *Escherichia coli*, que estimula o processo de fagocitose pelos neutrófilos, o que é refletido na medida da intensidade de fluorescência.

Não houve diferença estatisticamente significante nas intensidades de fluorescência gerada pelos neutrófilos (Figura 36) bem como nas porcentagens de células fagocíticas (Figura 37), entre os grupos controle DMSO e tratados com claritromicina e clofazimina em monoterapia e em politerapia, nos regimes de doses única e múltipla.

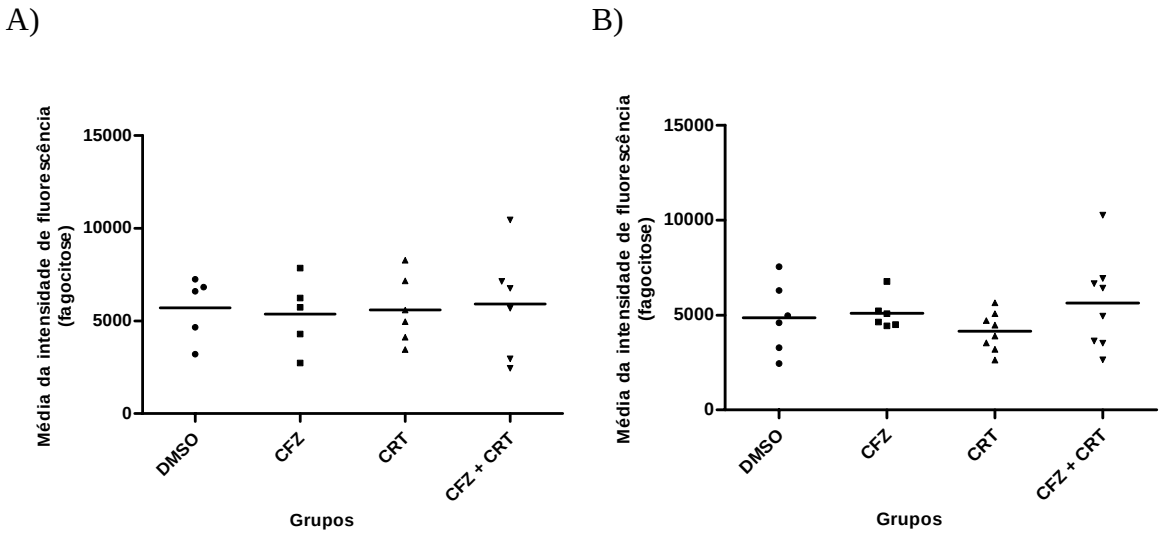

Figura 36. Média da intensidade de fluorescência produzida na fagocitose pelos neutrófilos de ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100 mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. Teste Análise de Variância, p>0,05 (A e B)

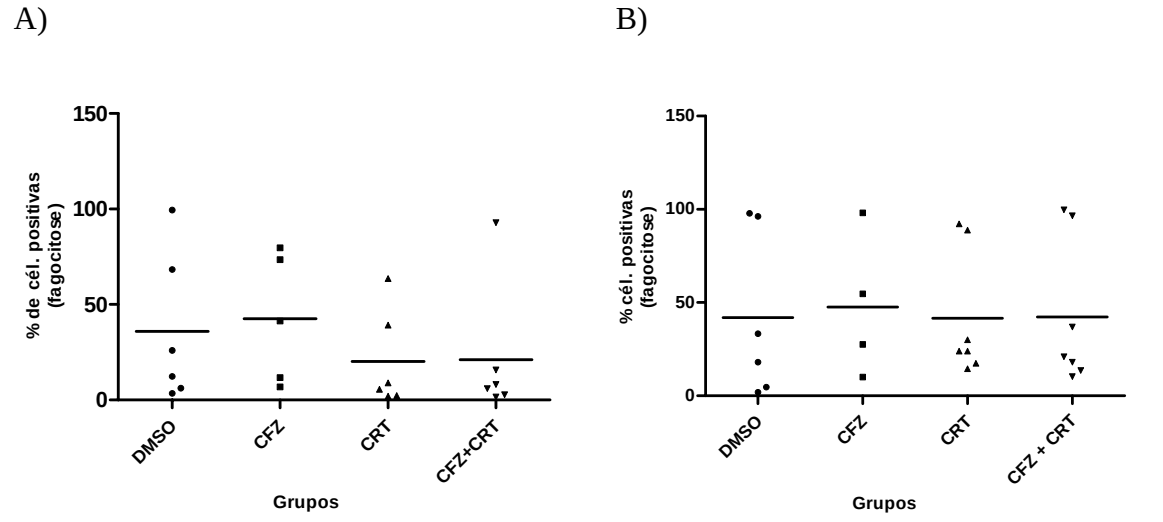

Figura 37. Porcentagem de neutrófilos fagocíticos de ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100 mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. Teste Análise de Variância, p>0,05 (A e B)

4.2.4 Parâmetros hemostáticos

Efeitos da clofazimina, claritromicina e da politerapia sobre o número de plaquetas do sangue periférico

Os fármacos administrados em mono ou politerapia, nos regimes de doses única e múltipla, não interferem no número de plaquetas dos ratos tratados (Figura 38).

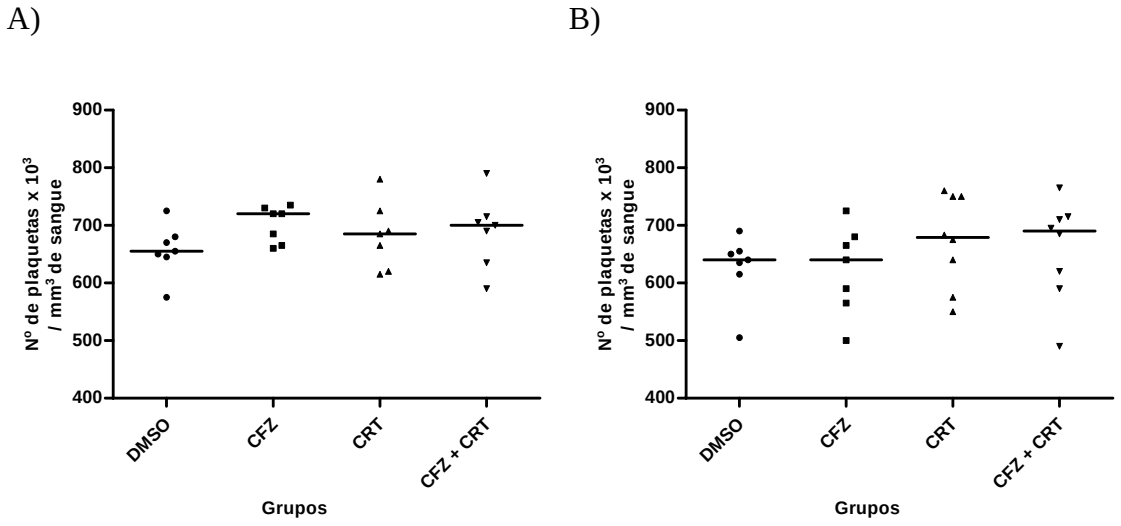

Figura 38. Número de plaquetas em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05 (A e B)

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

Não houve diferença estatisticamente significante nos valores dos tempos de protrombina (Figura 39) e tromboplastina parcial ativada (Figura 40) entre os grupos controle e tratados, em ambos os regimes de dosagem.

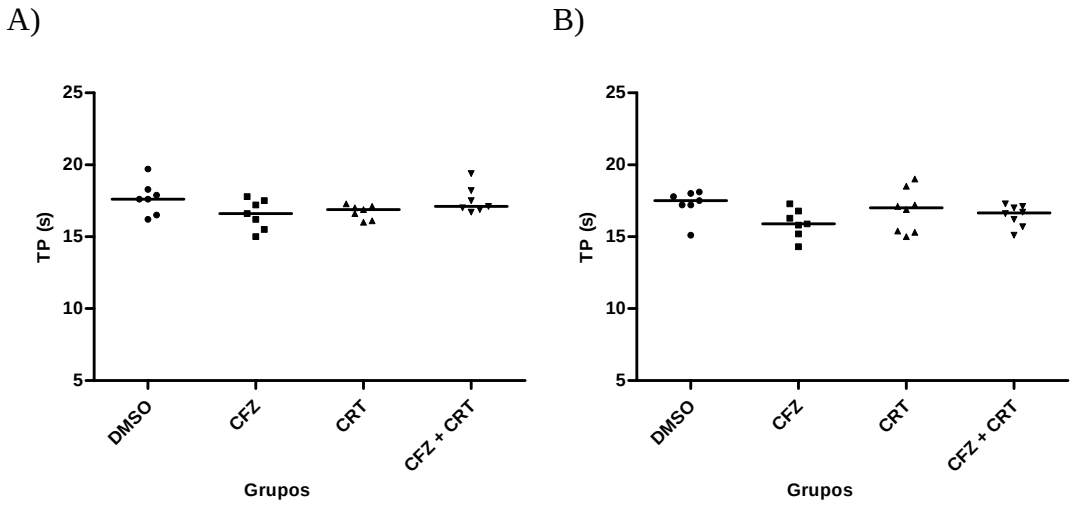

Figura 39. Tempo de protrombina em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05 (A e B)

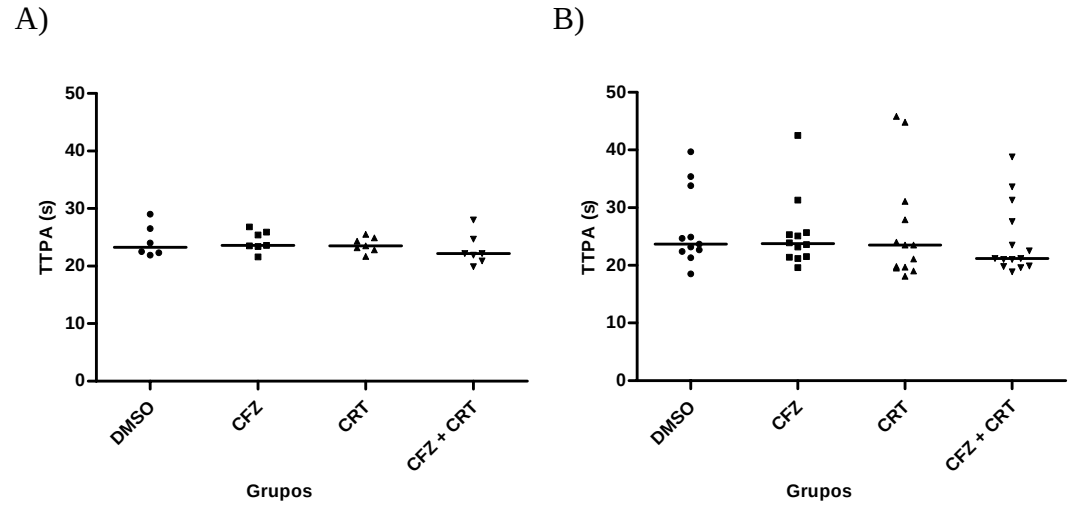

Figura 40. Tempo de tromboplastina parcial ativada em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05 (A e B)

Efeitos da clofazimina, claritromicina e da politerapia sobre a atividade dos fatores VII e X da coagulação sanguínea

As atividades dos fatores VII e X da coagulação estão representadas nas figuras 41 e 42. Em regime de dose única, não houve diferença estatística entre os grupos tratados e controle, para ambos os fatores (Figuras 41-A e 42-A).

Entretanto, no regime de doses múltiplas, é possível observar aumento significativo da atividade do fator VII no grupo de ratos tratados com claritromicina em relação ao controle DMSO e ao grupo de ratos tratados com clofazimina (Figura 41-B). Apesar da diferença não ser estatisticamente significante no grupo CFZ + CRT, percebe-se um aumento em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com clofazimina, sugerindo tendência de aumento em função da presença de claritromicina na mistura (Figura 41-B).

Houve também aumento significante da atividade do fator X nos ratos tratados com claritomicina tanto em relação ao DMSO como em relação à clofazimina, no regime de doses múltiplas. A atividade do fator X também foi maior no grupo no qual os animais receberam a os fármacos em politerapia, em relação ao controle DMSO (Figura 42-B).

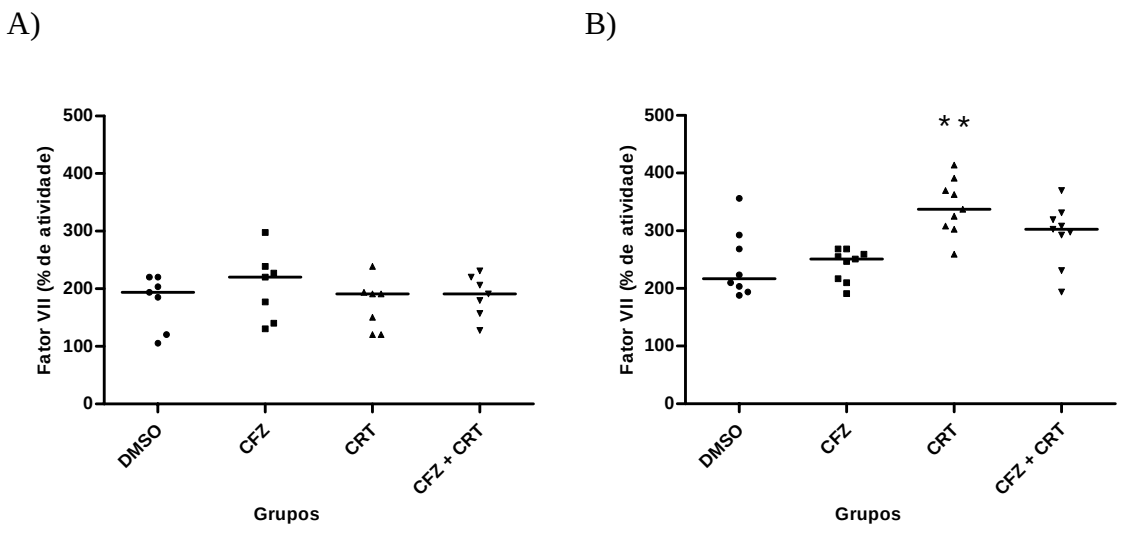

Figura 41. Atividade do fator VII da coagulação em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05 (A); **p<0,01 em relação ao DMSO e a CFZ (B)

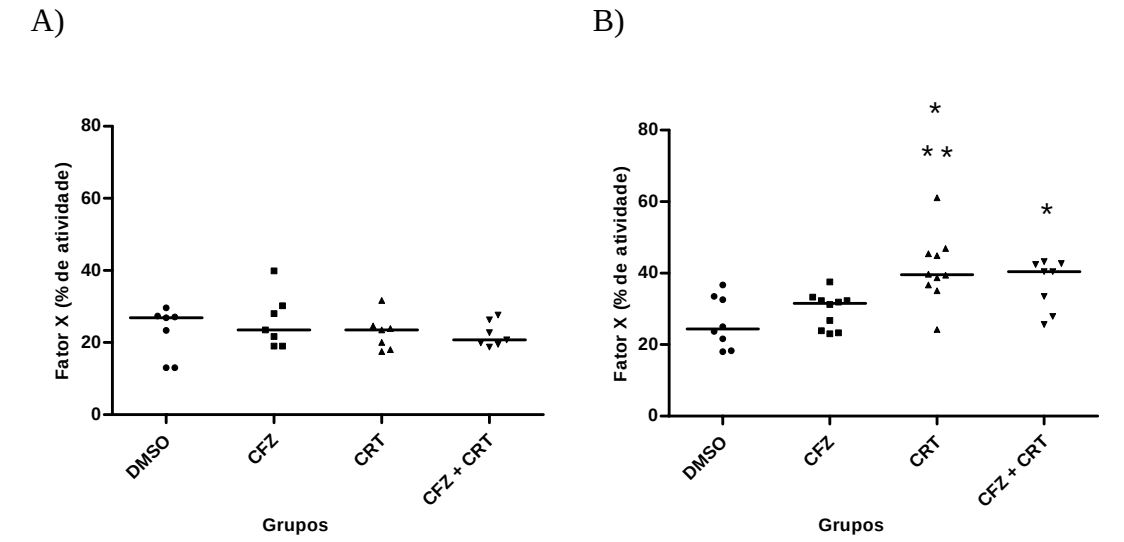

Figura 42. Atividade do fator X da coagulação em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05 (A); *p<0,05 em relação à CFZ, **p<0,01 em relação ao DMSO e *p<0,05 em relação ao DMSO (B).

4.2.5 Parâmetros bioquímicos

Efeitos da clofazimina, claritromicina e da politerapia sobre os níveis plasmáticos de gama-glutamiltransferase (γ-GT)

Os níveis plasmáticos de gama-glutamiltransferase (γ-GT) não sofreram alterações significantes quando da administração de clofazimina e claritromicina, em mono ou politerapia, em relação ao controle DMSO, tanto em regime de dose única (Figura 43-A) como em dose múltipla (Figura 43-B).

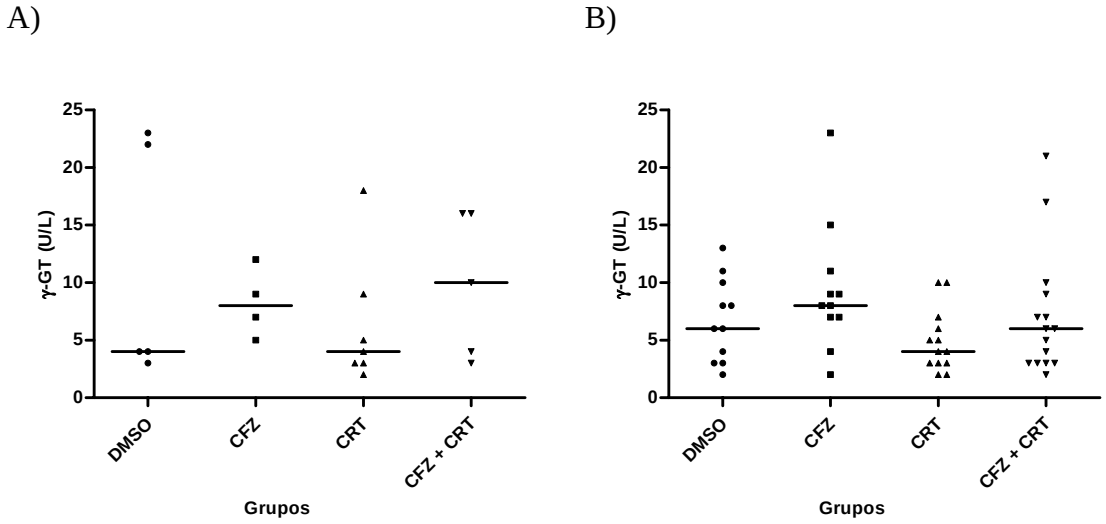

Figura 43. Níveis plasmáticos de gama-glutamiltransferase (γ-GT) em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05 (A e B)

Efeitos da clofazimina, claritromicina e da politerapia sobre os níveis plasmáticos de bilirrubinas total e direta

Clofazimina e claritromicina, administradas em mono ou politerapia, não provocaram alterações significantes nos níveis plasmáticos das bilirrubinas total (Figura 44) e direta (Figura 45), em ambos os regimes de dosagem.

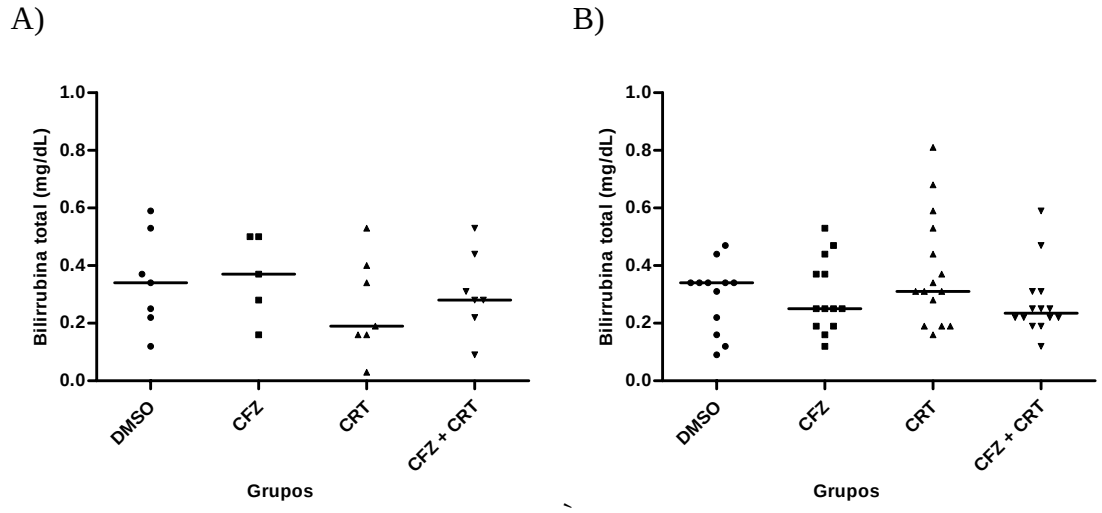

Figura 44. Níveis plasmáticos de bilirrubina total em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia, em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05 (A e B)

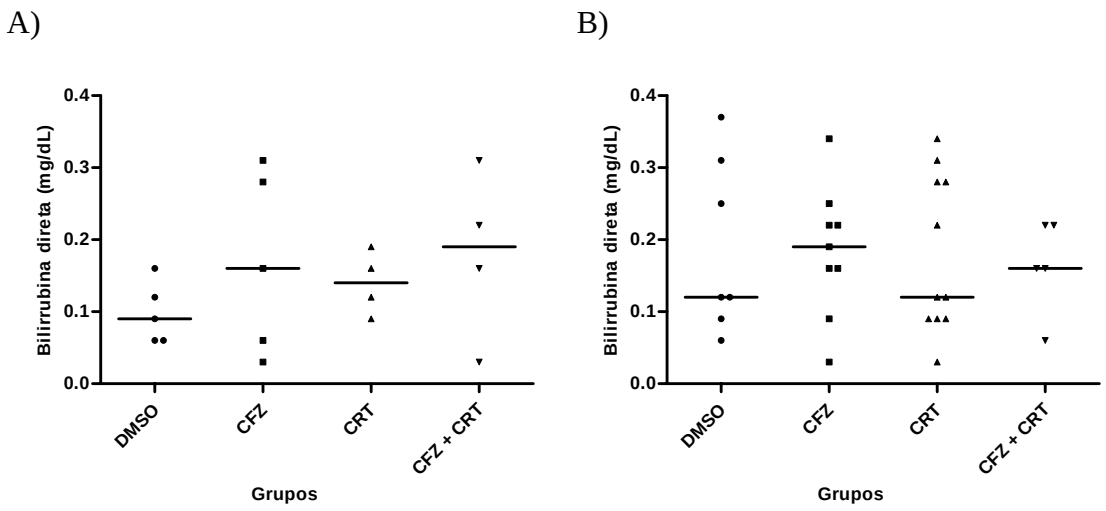

Figura 45. Níveis plasmáticos de bilirrubina direta em ratos tratados com clofazimina, claritromicina e a politerapia em regime de doses única (A) e múltipla (B), na dose de 100mg/kg de peso, comparados com o controle DMSO. As barras representam as medianas. Teste de Kruskal-Wallis, p>0,05 (A e B)

5. DISCUSSÃO

Infecção por *Mycobacterium. 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).

Clofazimina e claritromicina são também úteis no tratamento de pacientes hansenianos. 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 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). 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).

Devido à escassez de relatos referentes à toxicidade destes fármacos, em um estudo anterior observamos alterações em parâmetros hematológicos, hemostáticos e bioquímicos, decorrentes do uso de clofazimina e claritromicina de forma isolada (PAINA; QUEIROZ; SOUZA, 2008). Há poucos dados na literatura referentes aos efeitos adversos ocasionados

por ambos os fármacos, entretanto não há relatos que indiquem alterações destes parâmetros quando os fármacos são administrados em associação. 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.

Desta forma, neste estudo investigamos os possíveis efeitos adversos provocados pela administração dos medicamentos em monoterapia e politerapia através da avaliação de parâmetros hematológicos, hemostáticos e bioquímicos, e ainda estabelecemos a correlação dos efeitos adversos com a dose dos fármacos e desta com a concentração plasmática.

5.1 Pilotos

5.1.1 Concentração plasmática dos fármacos: estabelecimento do regime de doses múltiplas

No presente estudo piloto não houve diferença estatística entre os regimes testados a cada 24 horas durante 2, 3, 4 ou 5 dias. Paina, Queiroz e Souza (2008) evidenciaram efeitos adversos nos sistemas hematológico, hemostático e bioquímico de ratos tratados com clofazimina ou claritromicina quando os fármacos foram administrados em monoterapia, a cada 24 horas durante 04 dias consecutivos e a coleta do material biológico realizada após 24 horas da última dose. Desta forma, optamos por associar o esquema de tratamento do estudo de Paina, Queiroz e Souza (2008) com aqueles utilizados na prática clínica, em que clofazimina é administrada de uma a três vezes ao dia e claritromicina de uma a duas vezes ao dia, conforme relatado por Chambers (2007), Assem e colaboradores (2010) e Fujimura e colaboradores (2009). Assim, estabelecemos como melhor esquema de doses múltiplas a

administração de clofazimina e/ou claritromicina a cada 12 horas, durante 04 dias consecutivos e a coleta do material biológico realizada após 12 horas da última dose.

5.1.2 Ensaio piloto de anestésicos

O estudo piloto para determinar a dose e o tempo de ação dos anestésicos ketamina e xilazina foi necessário para garantir que sua ação não provocasse alterações no número de leucócitos. As doses e o tempo necessários para a sedação foram padronizados no ensaio piloto para que fossem os menores possíveis. Os resultados foram comparados ao estudo de Paina, Queiroz e Souza (2008), que utilizaram éter etílico como anestésico e não foram evidenciadas alterações leucocitárias.

Diferenças em parâmetros hematológicos podem ocorrer devido a diferenças de idade, sexo e/ou linhagem. Neste estudo, os grupos foram homogêneos em relação a estas variáveis. Ainda assim, optamos por realizar o estudo piloto para garantir que as contagens leucocitárias não seriam influenciadas pelos anestésicos.

Alguns estudos, como os de Weigand e colaboradores (2000), Son, Kang e Yang (2009), Zhou e colaboradores (2007) e Zilberstein et al (2002) mostram que ketamina pode provocar alterações em neutrófilos. Entretanto, não foram observadas quaisquer alterações nos leucogramas dos animais controle e tratados com clofazimina e claritromicina que pudessem ser atribuídas aos anestésicos.

Ratos não SPF

Foram observados alguns problemas com os ratos *não SPF* utilizados que podem indicar ocorrência de patologias, como pelagem escassa (queda de pêlos), presença de hérnias e alterações no comportamento. O número maior de leucócitos totais, mono e polimorfonucleares no grupo controle DMSO e nos grupos tratados com clofazimina e

claritromicina (Figuras 11 a 16), em relação ao estudo de Paina, Queiroz e Souza (2008), pode ser consequência destes sinais de doença. Segundo Medzhitov (2008), a resposta inflamatória aguda causada por infecção ou dano tissular envolve liberação de componentes do sangue para o local da infecção ou lesão. Proteínas plasmáticas e leucócitos, principalmente neutrófilos, que são normalmente restritos aos vasos sanguíneos vão para tecidos extravasculares no local da infecção ou lesão.

Estas alterações físicas comprometeram a avaliação adequada dos resultados não sendo possível determinar se o aumento do número de leucócitos era devido a estas condições ou pela ação dos anestésicos ketamina e xilazina. Assim, optamos por trabalhar com ratos SPF, provenientes do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A escolha permitiu a obtenção de resultados mais confiáveis, principalmente por se tratar de pesquisa em que se avaliam ação de fármacos e função celular. Além disso, pode-se utilizar menor número de animais, atendendo as orientações do Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisas.

Ratos SPF

No estudo com ratos SPF, utilizamos apenas 15 animais, enquanto no primeiro piloto, foram necessários 40 animais. Segundo Politi e colaboradores (2008), com a padronização microbiológica, tem-se conseguido reduzir o número de animais usados, sobretudo diminuindo as variações nos grupos de animais-teste e favorecendo o bem estar dos animais e dos profissionais envolvidos no processo, uma vez que diminuem os riscos de zoonoses. As patologias responsáveis pelas alterações físicas, detectadas no primeiro piloto, ocasionaram modificações nos números global e específico de leucócitos. Além disso, poderiam comprometer as outras etapas do estudo como avaliação de parâmetros hematológicos e da

função de neutrófilos, bem como avaliação bioquímica e concentração plasmática dos fármacos.

Conforme evidenciado nas figuras 17 a 22, os números global e específicos de leucócitos não foram afetados pela ação da associação ketamina (84 mg/kg) e xilazina (9 mg/kg) durante cerca de 10 minutos (tempo necessário para sedação e coleta de sangue). Estes resultados são comparáveis aos obtidos em estudo realizado por Paina, Queiroz e Souza (2008), em que foi utilizado éter etílico como anestésico. O número de células polimorfonucleares é maior em ratos tratados com clofazimina e claritromicina, em relação ao controle DMSO (Figuras 21 e 22), possivelmente devido à mobilização de neutrófilos marginados. Esta alteração não está associada aos anestésicos tem em vista que os mesmos resultados foram encontrados por Paina, Queiroz e Souza (2008)

Desta forma, estabeleceu-se o uso da associação ketamina e xilazina para a coleta de sangue em todos os experimentos, atendendo recomendação do Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisas.

5.2 Experimentos

5.2.1 Variação de peso dos animais em regime de dose múltipla

As tabelas 1 a 5 e a figura 23 mostram que ratos tratados com DMSO praticamente não perderam peso ao final dos quatro dias de tratamento do regime de doses múltiplas. Em contrapartida, os tratados com clofazimina perderam em média 8 % do seu peso corporal. Os que receberam claritromicina e aqueles em que foi administrada a associação dos fármacos tiveram perda de aproximadamente 18 % do peso total corporal.

Um dos efeitos adversos mais comumente associado ao uso dos macrolídeos é a intolerância gastrointestinal, sendo esta relacionada à dose. Os sintomas mais comuns são dor,

cólicas, flatulência, diarréia, náuseas e vômitos. Parece que a estimulação da motilidade gastrointestinal se dá pela ligação do fármaco ao receptor de motilina, sendo necessária a presença do grupo dimetilamino e açúcar neutro na posição C-3 do anel lactônico, característica dos macrolídeos de 14 e 15 membros (PISCITELLI; DANZIGER; RODVOLD, 1992; ZHANEL et al., 2001). Por isso este efeito adverso é mais frequente com o uso de eritromicina e menos frequente em pacientes que receberam azitromicina, claritromicina ou roxitromicina. Além disso, a administração intravenosa de eritromicina está mais associada com alta incidência de efeitos gastrointestinais quando comparada à administração via oral (ZHANEL et al., 2001). Em contrapartida, este efeito adverso como agonista de receptores de motilina tem sido usado com objetivos terapêuticos. Costalos e colaboradores (2002), Ng et al. (2001) e Chicella e colaboradores (2005) estudaram o uso de eritromicina no tratamento da intolerância alimentar em prematuros e crianças. Cucchiara e colaboradores (1997) relataram o uso de eritromicina no tratamento de desordens de motilidade.

Reações gastrintestinais como náuseas, vômitos e diarréia também podem ocorrer em consequência do uso de clofazimina, devido à deposição de cristais na mucosa intestinal (O'CONNOR; O'SULLIVAN; O'KENNEDY, 1996). Este armazenamento de cristais produz dor abdominal e é importante o diagnóstico correto através de alterações patológicas, além da própria informação acerca do uso do fármaco para evitar erros de diagnóstico. Como a clofazimina é útil no tratamento de várias doenças como hanseníase, desordens dermatológicas e infecções causadas pelo complexo *Mycobacterium avium* em pacientes com HIV, é fundamental que os médicos estejam cientes dos efeitos adversos causados pelo fármaco para evitar intervenções cirúrgicas desnecessárias (SUKPANICHNANT et al., 2000).

Uma vez que água e alimentação foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento, provavelmente a perda de peso aconteceu em consequência das alterações gastrointestinais citadas. As alterações de peso mais marcantes ocorreram nos grupos de

animais tratados com claritromicina em monoterapia e associada à clofazimina. No grupo de ratos em que foi administrada a associação dos fármacos a variação de peso é praticamente a mesma em relação ao grupo tratado com claritromicina isolada, ou seja, perda de aproximadamente 18% do peso corporal ao fim do tratamento, sugerindo que este efeito parece estar fortemente associado à presença de claritromicina na mistura.

Para ambos os fármacos, os efeitos são relacionados à dose e à duração do tratamento, cessando ao final da terapêutica. Entretanto, o monitoramento dos pacientes, especialmente os pediátricos utilizando macrolídeos, é fundamental para que seja instituído o esquema terapêutico mais adequado com ajustes da dose, a fim de se evitar efeitos adversos que, neste caso, podem comprometer a absorção de alimentos e medicamentos.

5.2.2 Concentração plasmática dos fármacos

Após a administração de clofazimina e claritromicina, em monoterapia e politerapia, em regime de doses única e múltipla de acordo com os esquemas de dosagem previamente propostos, foram obtidos os resultados apresentados nas figuras 24 a 29 e tabelas 6 a 9.

A análise dos resultados permite inferir que não houve alterações das concentrações plasmáticas de claritromicina quando administrada em monoterapia em relação ao esquema de associação, tanto em regime de dose única (Tabela 6 e Figura 24) como em regime de doses múltiplas (Tabela 7 e Figura 25). Do mesmo modo, não ocorreu alteração em nas concentrações plasmáticas de clofazimina em doses única (Tabela 8 e Figura 27) ou múltipla (Tabela 9 e Figura 28) tanto em monoterapia como em politerapia.

Claritromicina possui a propriedade de inibir o sistema enzimático citocromo P450, responsável pelo metabolismo dos fármacos (QUINNEY et al., 2010), e também a glicoproteína P, uma proteína de transporte envolvida na absorção, distribuição e eliminação de vários fármacos (SUGIE et al, 2004). Em humanos, claritromicina é conhecida por inibir o

CYP3A4. Em ratos, a isoforma do citocromo é a CYP3A23, que apresenta 73% de homologia com a isoforma humana (AHN et al, 2003). Portanto, quando utilizada em regimes de politerapia, pode ocasionar interações medicamentosas importantes.

Neste trabalho, os resultados dos experimentos mostraram que os esquemas posológicos utilizados não foram capazes de interferir nas concentrações plasmáticas dos fármacos, quando associados. Segundo Malfará, Uyemura e Queiroz (2005), diferenças interindividuais na oxidação de fármacos podem determinar variabilidade em sua farmacocinética, já que esta oxidação é catalisada por enzimas do CYP450 e a atividade de metabolização de fármacos através do CYP é determinada por fatores que variam de indivíduo para indivíduo, de acordo com a variabilidade genética, fatores ambientais e constitucionais.

A não observância de interações farmacológicas após a administração dos fármacos nos regimes de tratamento propostos é relevante, visto que estes medicamentos têm sido utilizados em associação no tratamento de algumas doenças (BRASIL, 1999; FIELD; COWIE, 2003; SUKPANICHNANT et al., 2000). Nossos resultados coincidem com os da literatura, que apontam que regimes de associação entre estes fármacos têm sido bem tolerados pelos pacientes (FIELD; COWIE, 2003). 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.

Houve redução estatisticamente significante das concentrações plasmáticas de claritromicina, isolada ou associada à clofazimina, bem como da clofazimina, isolada ou associada à claritromicina, em esquema de dose múltipla, em relação à dose única (respectivamente, Figuras 26 e 29).

Clofazimina apresentou, em esquema de dose única, concentração plasmática média de 127,3 ng/mL, em monoterapia, e de 128,2 ng/mL associada à claritromicina (Tabela 8). Em dose múltipla, a média de concentração plasmática para o fármaco isolado foi de 105,2 ng/mL e para a associação, de 104,6 ng/mL (Tabela 9). Segundo Venkatesan (1989), o pico de concentração plasmática de clofazimina ocorre de 4 a 8 horas após a administração do fármaco. Em nosso estudo, a coleta foi realizada após 2 horas em dose única e após 12 horas da última dose no esquema de dose múltipla, o que poderia justificar as diferenças entre os valores de concentração plasmáticas encontradas nos diferentes regimes de dosagem.

Em regime de dose única, a concentração de claritromicina foi em média 5,92 μg/mL do fármaco isolado e 5,62 μg/mL do fármaco associado à clofazimina (Tabela 6) e, em dose múltipla, a média de concentração plasmática para ambas as formas de administração foi de 2,36 μg/mL (Tabela 7). De acordo com Fraschini, Scaglione e Demartini (1993), as concentrações séricas máximas de claritromicina após dose única por via oral são proporcionais à dose e aparecem em cerca de 3 horas. Em doses múltiplas, as concentrações do estado de equilíbrio são alcançadas após 05 doses e as concentrações séricas máximas aparecem dentro de duas horas após a última dose. Estas características da farmacocinética da claritromicina justificam as diferenças entre os valores de concentração plasmática em regime de doses única e múltiplas encontradas em nosso estudo. Em dose única, a coleta de sangue foi realizada após 2 horas da administração e em dose múltipla, após 12 horas da última dose.

Para que o tratamento com antimicrobianos seja adequado e eficiente, minimizando tanto quanto possível os riscos de toxicidade, é importante considerar 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). Tanto clofazimina como claritromicina possuem a propriedade de se acumular nos polimorfonucleares (PMNs), o que favorece a morte de microrganismos intracelulares

(LABRO, 2000), por isso vários estudos têm testado a eficácia dos antimicrobianos *in vitro*. Entretanto, enquanto algumas bactérias intracelulares podem residir nos fagossomos das células em pH neutro, uma grande proporção também pode residir nos fagolisossomos, e a atividade do fármaco em meio ácido pode se reduzir significativamente. Assim, modelos *in vitro* podem não refletir os processos biológicos que ocorrem *in vivo* (HEIFETS, 1996).

Desta forma, a determinação das concentrações plasmáticas dos fármacos é importante, pois reflete de forma mais fidedigna os possíveis efeitos adversos, podendo, através de ajustes nas doses, proporcionar esquemas de tratamento mais eficazes e seguros para o paciente.

5.2.3 Parâmetros hematológicos

Em regime de doses múltiplas, a análise da série leucocitária mostrou que tanto claritromicina como clofazimina, em monoterapia e em politerapia, provocaram aumento do número de leucócitos. Apesar de não ter havido significância estatística, observa-se que o grupo de animais tratados com clofazimina apresentou valor de mediana superior ao grupo controle DMSO (Figura 30). Dentre os efeitos adversos observados para eritromicina, um análogo estrutural da claritromicina, estão leucocitose e eosinofilia, mas em geral todas as manifestações desaparecem dentro de poucos dias após a suspensão do tratamento (CHAMBERS, 2007).

Houve redução do número de células mononucleares de ratos que foram tratados com CRT e CFZ + CRT, em dose única. Embora não tenha sido verificada significância estatística entre os grupos, pelo pós-teste de Dunns, houve diferença entre as medianas ($p<0,05$), segundo o teste de Kruskal-Wallis (Figura 31-A). Com relação ao número destas células em regime de dose múltipla, houve redução tanto no grupo CRT como CFZ + CRT, embora significância estatística tenha sido observada apenas no grupo da politerapia (Figura 31-B).

Houve aumento do número de células polimornucleares, nos grupos tratados com CFZ, CRT e CFZ + CRT em relação ao controle DMSO (Figura 32).

Observou-se tendência de redução de células mononucleares e aumento das polimorfonucleares dos grupos tratados com doses múltiplas, em relação ao controle com dose única. Assim, parece que os fármacos levam a uma inversão da proporção entre células mono e polimorfonucleares, provavelmente devido à mobilização de neutrófilos marginados, visto que o tempo de duas horas, entre a injeção dos fármacos e controles e a coleta, não é suficiente para este aumento ser justificado por alteração na produção das células. Em doses múltiplas, podem-se fazer as mesmas observações em relação à proporção de células, mas os efeitos são mais evidentes, podendo indicar até mobilização de neutrófilos do compartimento de reserva da medula óssea. Neste caso, o mecanismo pode estar relacionado às ações antimicrobiana e antiinflamatória dos fármacos, que influenciam a resposta funcional dos neutrófilos, avaliada neste trabalho através do *burst* oxidativo e da fagocitose.

Em relação às células mononucleares, tem sido relatado que há redução do número de linfócitos no lavado bronco-alveolar de pacientes com doença crônica no trato respiratório que utilizaram macrolídeos em longo prazo. Ishimatsu e colaboradores (2004) testaram o efeito dos macrolídeos sobre linfócitos isolados do sangue periférico humano e verificaram indução de apoptose, evidenciando o efeito antiinflamatório de claritromicina, azitromicina e josamicina. Em um estudo que testou o efeito da claritromicina sobre os linfócitos na infecção respiratória por *Pseudomonas aeruginosa* houve redução do número destas células nos pulmões dos camundongos tratados, resultados similares aos estudos da doença pulmonar em humanos (YANAGIHARA et al., 1997).

A análise da intensidade de fluorescência produzida pelo *burst* oxidativo de neutrófilos em ratos tratados em regime de dose única (Figura 34-A) permite inferir que houve aumento do *burst* nas células estimuladas com PMA em relação às não estimuladas ou

às estimuladas com fMLP, independente do tratamento, ou seja, não houve diferenças entre os grupos tratados com DMSO, CFZ, CRT ou CFZ + CRT. Entretanto, nos grupos tratados em regime de doses múltiplas (Figura 34-B), houve aumento da atividade de *burst* oxidativo em todos os grupos tratados com os fármacos, seja em monoterapia ou politerapia, quando estimulados com PMA, em relação às células não estimuladas e às estimuladas com fMLP. A análise de variância permitiu concluir que o aumento da atividade do *burst* oxidativo ($p<0,001$) seguiu a seguinte ordem CFZ < CRT < CFZ + CRT, em relação ao DMSO (Figura 34-B). Segundo Vuorte, Jansson e Repo (1996), poucos receptores para fMLP estão disponíveis para ligação nos neutrófilos. O PMA é um estímulo potente, lipofílico, atravessa facilmente a membrana celular e ativa o *burst* oxidativo por meio da ativação da proteína kinase C (PKC), por ser um análogo estrutural do diacilglicerol (SHEPPARD et al., 2005).

A intensidade de fluorescência produzida pela fagocitose dos neutrófilos não apresentou diferença entre o grupo controle DMSO e os tratados com os fármacos, em todos os regimes testados (Figuras 36 e 37). A literatura é controversa com relação à fagocitose realizada por neutrófilos quando do uso de claritromicina. Wenish et al. (1996) observaram redução da fagocitose, enquanto Xu et al. (1995), Scaglione et al. (1993) e Roszkowski et al. (1990) observaram aumento. Diferenças na metodologia, modelos animais e humanos, concentrações do fármaco, estudos *in vivo* e *in vitro* e protocolos de dosagem e administração podem explicar, em parte, as diferenças entre os resultados (LABRO, 2000).

Há alguns estudos relacionados à modulação do anestésico ketamina sobre a adesão, atividade fagocítica e/ou *burst* oxidativo de neutrófilos (SON; KANG; YANG, 2009; WEIGAND et al., 2000; ZHOU et al., 2007; ZILBERSTEIN et al., 2002). Entretanto, o tempo de ação do anestésico utilizado em nosso estudo foi em média de 10 minutos, tempo suficiente para a sedação e colheita do material biológico. Em contrapartida, o efeito dos fármacos se estendeu por 2 horas em dose única e 04 dias em doses múltiplas. Mesmo em

regime de dose múltipla, a anestesia foi realizada somente após 12 horas da última dose, ou seja, no quinto dia. Portanto, provavelmente os efeitos verificados com relação ao *burst* e à fagocitose dos neutrófilos foram provocados por clofazimina e claritromicina, em mono ou politerapia. Além disso, a utilização de grupos controle DMSO comparados com os tratados com CFZ e CRT descartam alterações decorrentes do uso do anestésico, pois todos passaram pelos mesmos procedimentos.

Em condições normais, os neutrófilos circulam livremente pelo sangue periférico. Na presença de resposta inflamatória aguda causada por infecção ou lesão tecidual, há recrutamento de leucócitos para o local da lesão e mediadores pró-inflamatórios induzem alterações no endotélio vascular que sinalizam para neutrófilos circulantes rolar, aderir e atravessar o endotélio (EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008). O processo de destruição intracelular de microrganismos ocorre pela aderência do neutrófilo à bactéria, fagocitose do patógeno e liberação do conteúdo dos grânulos, 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).

Clofazimina estimula a geração de oxidantes como o ânion radical superóxido nos neutrófilos, o que contribui para a defesa do organismo contra patógenos intracelulares (LEMKE, 1995). Também apresenta diferentes efeitos sobre o sistema imune, como aumento do número e tamanho dos lisossomos e fagolisossomos de macrófagos, inibição da solubilização de complexos imunes mediada pelo complemento (O'CONNOR; O'SULLIVAN; O'KENNEDY, 1995) e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelos leucócitos polimorfonucleares devido à estimulação de fosfolipase A2, com consequente acumulação de ácido araquidônico e lisofosfolipídeos, que agem como segundos-mensageiros para ativar a oxidase (LABRO, 2000). Adipócitos e células do sistema monocítico fagocitário possuem receptores específicos para o LDL. Como é transportada pelo

LDL (*low-density lipoprotein*), a clofazimina possui a propriedade de se concentrar nas células fagocíticas, um dos principais alvos micobacterianos. Estes efeitos, somados à ação antibacteriana direta, explicam seus efeitos antimicobacterianos (O'CONNOR; O'SULLIVAN; O'KENNEDY, 1995).

A clofazimina concentra-se nas membranas e esta associação estabiliza a forma catiônica do fármaco, que é a forma redox ativa. A transferência de elétrons de NADH para CFZ torna o fármaco instável, e este passa a reagir com O_2, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs). CFZ possui efeitos antiinflamatórios nos neutrofilos, macrófagos e linfócitos. Alterações fisiológicas relatadas nestas células incluem aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), mas a redução direta do CFZ nestas células não foi demonstrada (YANO el al., 2010).

Nosso estudo evidenciou o aumento da atividade do *burst* oxidativo de neutrófilos em ratos tratados com clofazimina, em regime de doses múltiplas, corroborando com os dados da literatura que se referem à geração de EROs como mecanismo de ação antimicrobiano, contribuindo para o combate às infecções. Entretanto, dados disponíveis na literatura (ABDELGHAFFAR; VAZIFEH; LABRO, 1997; ABDELGHAFFAR et al., 2002; JAIN et al., 2002; KADIR et al., 2000; KADOTA et al., 1998; SUGIHARA et al., 2003; UMEKI, 1993) relatam que os macrolídeos inibem a produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos.

Em nosso estudo, a análise do *burst* oxidativo e da fagocitose de neutrófilos foi feita *ex vivo,* através da avaliação dos PMNs oriundos do sangue periférico de ratos. Segundo Labro (2000), há problemas de extrapolação dos dados para o potencial imunomodulatório de um fármaco. Os modelos animais diferem dos humanos no que se referem ao metabolismo dos fármacos, funções, receptores fagocíticos e cronobiologia. Há ainda diferenças entre as espécies, variabilidade individual e variações cronobiológicas entre homens e animais.

Problemas de isolamento de células podem interferir nos resultados, pois pela separação do fagócito do seu contexto, pode haver supressão induzida pelo fármaco de um fator necessário para modulação do fagócito (LABRO, 2000). O método usando sangue total evita a separação dos granulócitos e ativação celular, além de possuir alta precisão e reprodutibilidade (WENISH et al., 1996). Outro ponto a ser considerado são as diferentes capacidades funcionais de vários *pools* de granulócitos e monócitos/macrófagos. Além disso, há problemas relacionados à padronização de técnicas em diferentes laboratórios e, às vezes, artefatos introduzidos pela própria técnica (LABRO, 2000).

Uma questão importante a ser considerada é com relação às diferenças da metodologia utilizada em nosso estudo, quando comparadas às dos autores que verificaram inibição da produção de EROs, induzida pela claritromicina. Em alguns deles houve incubação dos fármacos com as células de interesse, *in vitro* ou *ex vivo* (ABDELGHAFFAR; VAZIFEH; LABRO, 1997; ABDELGHAFFAR et al., 2002; JAIN et al., 2002; KADIR et al., 2000; KADOTA et al., 1998; SUGIHARA et al., 2003; UMEKI, 1993). No protocolo utilizado por nós, a administração dos fármacos foi realizada intraperitonealmente nos ratos, para a avaliação da concentração plasmática efetivamente responsável pelos possíveis efeitos adversos investigados. A avaliação do *burst* e fagocitose foi feita após a colheita do sangue dos animais e apenas a estimulação com fMLP e PMA foi *ex vivo*, fato que pode ter sido fonte de resultados controversos em relação aos trabalhos citados.

Para avaliação da atividade do *burst*, os trabalhos de Abdelghaffar; Vazifeh; Labro (1997), Abdelghaffar e colaboradores (2002), Jain e colaboradores (2002), Kadir e colaboradores (2000), Kadota e colaboradores (1998), Sugihara e colaboradores (2003) e Umeki (1993) utilizaram técnicas como ensaio de redução do citocromo c ou quimioluminescência por luminol/lucigenina, que avaliam a liberação de EROs no meio extracelular. A citometria de fluxo, utilizando diferentes sondas, avalia a medida da difusão

intracelular de EROs. A dihidrorodamina-123 (DHR-123), sonda fluorescente utilizada em nosso trabalho para detecção das EROs, atravessa livremente a membrana das células e, após oxidação a rodamina-123, emite fluorescência. Como DHR liga-se às membranas celulares e mitocondriais, o sinal fluorescente detectado é intracelular e responsivo à presença específica de H_2O_2 (ELBIM; LIZARD, 2009). Estudos de Wenisch et al. (1995) e Wenisch et al. (1996) avaliaram a atividade do *burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos usando citometria de fluxo para determinar o efeito do tratamento antimicrobiano e verificaram que pacientes tratados com claritromicina não apresentaram alteração na produção de EROs. Estudos semelhantes de Shirai, Sato e Chida (1995) detectaram aumento da atividade do *burst* oxidativo de neutrófilos. Métodos como quimioluminescência e testes de redução do nitrobluetetrazolium exibem ampla variação intra e interensaios e têm sido considerados de baixa precisão (WENISCH et al., 1996).

Outro ponto a ser considerado é a relação entre concentração plasmática e/ou intracelular dos macrolídeos e a capacidade fagocitária dos PMNs e produção de espécies reativas de oxigênio. Os trabalhos citados (ABDELGHAFFAR; VAZIFEH; LABRO, 1997; ABDELGHAFFAR et al., 2002; JAIN et al., 2002; KADIR et al., 2000; KADOTA et al., 1998; SUGIHARA et al., 2003; UMEKI, 1993) tiveram controle da concentração do fármaco responsável pela inibição *in vitro* da geração de EROs pelo neutrófilo, visto que a incubação dos fármacos foi realizada diretamente com as células. Nosso trabalho avaliou apenas a concentração plasmática dos fármacos, não tendo resultados referentes à concentração intracelular. Estudos de Wenisch et al. (1996) relataram que o grau de concentração intracelular de um antimicrobiano no fagócito não necessariamente correlaciona-se com a atividade intracelular do fármaco. Devem ser consideradas a penetração e sua localização intracelular.

Vários fatores influenciam a atividade dos antibióticos *in vivo*. É importante considerar a susceptibilidade do agente infeccioso, o perfil de concentração do fármaco no plasma, em outros fluidos corporais e nos tecidos, e também o sítio de infecção, em relação ao regime de dosagem (BAKKER-WOUDENBERG et al., 2005). Amsden (2001) relata que há o aumento ou redução da concentração do fármaco nos fagócitos é diretamente proporcional às concentrações séricas. O autor aponta também que estudos de susceptibilidade *in vitro* não refletem as concentrações do antibiótico às quais o patógeno é exposto no local da infecção uma vez que ele é fagocitado pelo sistema imune. Outra desvantagem de determinações *in vitro* da concentração mínima inibitória é que os testes não consideram a atividade inerente do plasma, que pode causar alterações em seus valores.

Outra questão reside na inversão da proporção entre células mono e polimorfonucleares. O número aumentado de leucócitos polimorfonucleares poderia justificar o aumento da ação funcional dos neutrófilos, ou seja, do *burst* oxidativo. Todos os fatores citados podem se relacionar aos dados controversos apresentados na literatura em relação aos efeitos da claritromicina sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos.

Citocinas proinflamatórias são importantes mediadores da 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 proinflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF-α, e também por inibir a produção de prostaglandina E_2, 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 μg/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 μg/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. Eles inibem as moléculas de adesão, que permitem o extravasamento de neutrófilos, e reduzem o acúmulo dos neutrófilos nas vias aéreas pela inibição da expressão de citocinas proinflamatórias, como IL-1, IL-8 e TNF-α (TAMAOKI; KADOTA; TAKIZAWA, 2004). Sugiyama e colaboradores (2007) pesquisaram o efeito de claritromicina sobre a produção de citocinas pelas células dendríticas e células T e verificaram que o fármaco inibiu a produção de IL-2 e IL-6, que causa supressão da ativação de células B, melhorando o status da doença pulmonar. Além disso, houve aumento da produção de IL-10, a qual tem a propriedade de inibir a produção de IL-2, IL-8 e TNF-α, que são citocinas pró-inflamatórias. De forma similar, Mukae e colaboradores (2010) verificaram que infecções por *Pseudomomas aeruginosa* alteram as funções das células dendríticas e que os macrolídeos funcionam como agentes antiinflamatórios modulando as funções destas células por reduzirem a produção de IL-6, IL-12 e TNF-α.

A redução de neutrófilos nas vias aéreas dos pacientes também leva a redução da liberação de leucotrieno B_4 e enzimas dos grânulos, como β-glicuronidase, hidrolase e lisosima, além da redução da produção de espécies reativas de oxigênio, que podem causar lesão tecidual (DIEP et al., 2010). 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 (YANAGIHARA et al, 1997).

A secreção de citocinas, como 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). 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. Esta é mediada por uma gama de citocinas, promovendo alterações na produção e liberação das células sanguíneas, 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.

Não verificamos nenhum relato na literatura sobre a função dos neutrófilos quando ratos são tratados com a associação clofazimina e claritromicina. Verificamos que o *burst* oxidativo foi maior nesses animais do que naqueles tratados com os fármacos em monoterapia, o que sugere um efeito sinérgico de ação antimicrobiana, já que ambos os fármacos possuem a capacidade de se acumular nos fagócitos. Ainda são necessários estudos para elucidar os possíveis mecanismos relacionados a estes efeitos, Como a politerapia tem sido recomendada no tratamento da hanseníase (BRASIL, 1999) e de infecções pelo complexo *Mycobacterium avim* (FIELD; COWIE, 2003), nossos dados podem contribuir para estudos sobre os efeitos relacionados a estas terapias.

5.2.4 Parâmetros hemostáticos

Não foram observadas alterações na contagem de plaquetas e nem nos tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (TTPA) quando os ratos foram tratados

com os fármacos, em monoterapia e em politerapia, em ambos os regimes de dosagem (Figuras 38, 39 e 40). Wallace, Brown e Griffith (1995) relataram aumento do TP em apenas 1% de pacientes adultos utilizando claritromicina. Apesar dos estudos de Paina, Queiroz e Souza (2008) terem verificado aumento no TP e TTPA em ratos tratados com claritromicina, no presente trabalho foram utilizados ratos SPF, diferentes regimes de dosagem e a metodologia utilizada para determinação do TP e TTPA naquele trabalho foi manual e neste, automatizada.

Os fatores VII e X (respectivamente, Figura 41-B e Figura 42-B) tiveram suas atividades aumentadas nos animais tratados com CRT e CFZ + CRT em regime de dose múltipla, o que evidencia que a cascata da coagulação está mais ativada na presença dos fármacos.

Millrose e colaboradores (2008) estudaram os efeitos dos macrolídeos sobre as células endoteliais e verificaram efeito citotóxico sobre estas células. O endotélio desempenha papel fundamental para a interação com leucócitos e plaquetas, expressando vários antígenos em sua superfície para permitir o recrutamento e a migração de leucócitos para o local de inflamação. Lanbeck, Odenholt e Riesbeck (2004) têm relatado que os macrolídeos induzem flebite quando há infusão dos fármacos e são citotóxicos para as células endoteliais. A patogênese da flebite de infusão não está clara, mas a toxicidade química parece levar à inflamação através da expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) e subsequente trombose. Segundo van de Stolpe e van der Saag (1996), TNF-α, entre outras citocinas, aumenta a expressão de ICAM-1 através do fator nuclear-κB. Entretanto, um dos efeitos dos macrolídeos é a inibição da expressão de citocinas proinflamatórias, como TNF-α (MUKAE et al., 2010; SUGIYAMA et al., 2007; TAMAOKI; KADOTA; TAKIZAWA, 2004). Zimmerman e colaboradores (2001) verificaram o desenvolvimento de tromboflebite em vários pacientes no local da infusão com claritromicina.

Como se vê, as interações existentes entre fármacos, endotélio e citocinas, no que se refere aos mecanismos pró e antiinflamatórios, são complexas. O aumento da atividade dos fatores poderia estar ligado à lesão endotelial causada pelo fármaco, relacionada à ocorrência de tromboflebite por infusão do antibiótico. No entanto, novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos patobioquímicos envolvidos, principalmente no que se refere ao efeito de aumento da atividade dos fatores VII e X em ratos tratados com a politerapia CFZ + CRT.

5.2.5 Parâmetros bioquímicos

A análise estatística dos níveis plasmáticos de gama-glutamiltransferase (γ-GT) (Figura 43) e de bilirrubinas total (Figura 44) e direta (Figura 45) revelam que houve grande dispersão dos dados em torno das medianas. Este fato pode explicar a ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados e controle.

Segundo Motta (2003), por estar presente em grandes quantidades no retículo endoplasmático liso, a atividade de γ-GT é susceptível a aumento induzido por fármacos, inclusive os antimicrobianos. De acordo com Wilkinson (2003), a biotransformação dos fármacos ocorre no retículo endoplasmático, o que justificaria as alterações. Paina, Queiroz e Souza (2008) verificaram aumento dos níveis de γ-GT em ratos tratados com claritromicina em regime de doses múltiplas, na dose de 100 mg/kg de peso.

Alguns estudos indicaram aumento de bilirrubina total em cerca de 1% dos pacientes e disfunção hepática, inclusive colestase, naqueles que receberam claritromicina (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 que, segundo Balistreri e Rej (1998), é caracterizada pelo aumento de bilirrubina conjugada, pela secreção diminuída nos canalículos ou drenagem reduzida.

Vários macrolídeos têm demonstrado provocar elevação de enzimas hepáticas. Embora os mecanismos envolvidos não sejam bem esclarecidos, é possível que estejam envolvidas reações tóxicas e hipersensibilidade. Entretanto, claritromicina, fluritromicina, roxitromicina, miocamicina, josamicina e midecamicina apresentam baixo potencial hepatotóxico (ZHANEL et al., 2001).

6. CONCLUSÕES

6.1 Pilotos

6.1.1 Concentração plasmática dos fármacos: estabelecimento do regime de doses múltiplas

Não houve diferenças significantes nas concentrações plasmáticas dos fármacos nos esquemas terapêuticos estabelecidos para o regime de doses múltiplas. O esquema terapêutico utilizado, em regime de doses múltiplas, foi administração dos fármacos a cada 12 horas durante 4 dias consecutivos e a coleta de sangue após 12 horas da última dose.

6.1.2 Ensaio piloto de anestésicos

Os anestésicos ketamina, na concentração de 84 mg/kg e xilazina, na concentração de 9 mg/kg associados não afetaram os números dos leucócitos totais, polimorfonucleares e células mononucleares, o que viabilizou a utilização dos anestésicos nos procedimentos de coleta de sangue.

6.2 Experimentos

6.2.1 Variação de peso dos animais em regime de dose múltipla

Clofazimina e claritromicina, administradas em mono ou politerapia, em regime de doses múltiplas, provocaram perda de peso significativa nos ratos.

6.2.2 Concentração plasmática dos fármacos

Não houve diferenças entre as concentrações plasmáticas dos fármacos administrados em monoterapia, em relação ao esquema de politerapia. As concentrações de ambos os fármacos, em regime de doses múltiplas, foram menores quando comparadas ao regime de dose única.

6.2.3 Parâmetros hematológicos

Claritromicina, em mono ou politerapia, provocou aumento do número de leucócitos, em dose única, aumento de células polimorfonucleares e redução do número de células mononucleares, em ambos os regimes de dosagem. Os fármacos parecem inverter a proporção entre células mono e polimorfonucleares.

Houve aumento da atividade de *burst* oxidativo de neutrófilos nos ratos tratados com clofazimina e claritromicina, em monoterapia, no esquema de dose múltipla. Este aumento foi mais evidente quando os fármacos foram administrados em regime de politerapia.

6.2.4 Parâmetros hemostáticos

Os ratos que receberam claritromicina em mono ou politerapia, em doses múltiplas, tiveram aumento significativo da atividade dos fatores VII e X da coagulação sanguínea.

6.2.5 Parâmetros bioquímicos

Os níveis plasmáticos de gama-glutamiltransferase e de bilirrubinas total e direta variaram largamente, o que pode explicar a ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados e controle.

Concluindo:

♦ Clofazimina e claritromicina provocaram alterações em parâmetros hematológicos e hemostáticos, nos esquema de monoterapia e politerapia.

♦ A determinação dos valores de concentração plasmática foi essencial para o estabelecimento de sua correlação com os efeitos adversos observados nos diferentes esquemas de tratamento.

♦ A utilização de ratos SPF foi fundamental para a realização deste estudo, pois permitiu o uso de menor número de animais e determinou maior confiabilidade nos resultados.

7. 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.

ABDELGHAFFAR, H.; VAZIFEH, D.; LABRO, M.T. Erythromycin A-derived macrolides modify the functional activities of human neutrophils by altering the phospholipase D-phosphatidate phosphohydrolase transduction pathway: L-cladinose is involved both in alterations of neutrophil functions and modulation of this transductional pathway. **J. Immunol.**, Baltimore, v.159, p.3995-4005, 1997.

ABDELGHAFFAR, H.; KIRST, H.; SOUKRI, A.; BABIN-CHEVAVE, C.; LABRO, M.T. Structure-activity relationships among 9-N-alkyl derivatives of erythromycylamine and their effect on the oxidative burst of human neutrophils in vitro. **J. Chemother.**, Firenze, v.14, p.132-139, 2002.

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.

AHN, C.Y.; KIM, E.J.; KWON, J.W.; CHUNG, S.J.; KIM, S.G.; SHIM, C.K.; LEE, M.G. Effects of cysteine on the pharmacokinetics of intravenous clarithromycin in rats with protein-calorie malnutrition. **Life Sci**., Oxford, v.73, p.1783-1794, 2003.

AITHAL, P.G.; DAY, C.P. The natural history of histologically proved drug induced liver disease. **Gut.**, London, v.44, p.731-735, 1999.

AMSDEN, G.W. Advanced-generation macrolides: tissue-directed antibiotics. **Int. J. Antimicrob. Agents**., Amsterdan, v.18 Suppl 1, p.11-15, 2001.

ASSEM, M.; EL AZAB, G.; RASHEED, MA.; ABDELFATH, M.; SHASTERY, M. Efficacy and safety of levofloxacin, clarithromycin and esomeprazol as first line triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication in Middle East. Prospective, randomized, blind, comparative, multicenter study. **Eur. J. Intern Med**., Amsterdam, v.21, p. 310-314, 2010.

BABIOR, B.M. The leukocyte NADPH oxidase. **Isr. Med. Assoc. J.**, Ramat Gan, v.4, p.1023-1024, 2002.

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.

BITZINGER, D.I.; SCHLACHETZKI, R.L.; LINDNER, R.; TRABOLD, B.; DITTMAR, M.S. Flow-cytometric measurement of respiratory burst in rat polymorphonuclear granulocytes: comparison of four cell preparation procedures, and concentration – response evaluation of soluble stimulants. **Cytometry**., New York, v.73A, p.643-650, 2008.

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**., Mcgraw-Hill Medical, 7th ed., 2006. p.369-385.

CASSELL, 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. Inibidores da síntese de proteínas e agentes antibacterianos diversos. In: BRUNTO, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica.** McGraw-Hill, 11th ed., 2007. cap.46, p.1055-1082.

CHICELLA, M.F.; BATRES, L.A.; HEESTERS, M.S.; DICE, J.E. Prokinetic drug therapy in children: a review of current options. **Ann. Pharmacother**., Cincinnati, v.39, p.706-711, 2005.

CHIU, B.; MELIN-ALDANDA, H.; PILLAI, S.; CHU, F.; SUPERINA, R.A. Factor VII transcription correlates with hepatocyte proliferation and hepatocyte growth factor expression in a rodent extrahepatic portal vein obstruction model. **J. Am. Coll. Surg.**, Chicago, v.205, p.277-283, 2007.

CLOFAZIMINE. **Tuberculosis**, Livingstone: Elsevier, 2008, v.88, p.96-99.

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

COLVIN, B.T. Physiology of haemostasis. **Vox Sang**., Oxford, v.87, p.S43-S46, 2004.

COSTALOS, C.; GOUNARIS, A.; VARHALAMA, E.; KOKORI, F.; ALEXIOU, N.; KOLOVOU, E. Erythromycin as a prokinetic agent in preterm infants. J. Pediatr. **Gastroenterol. Nutr**., Philadelphia, v.34, p.23-25, 2002.

CUCCHIARA, S.; MINELLA, R.; SCOPPA, A.; EMILIANO, M.; CALABRESE, F.; AZ-ZEGEH, N.; REA, B.; SALVIA, G. Antroduodenal motor effects of intravenous erythromycin in children with abnormalities of gastrointestinal motility. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr**., New York, v.24, p.411-418, 1997.

CULIC, O.; ERAKOVIC, V.; PARNHAM, M.J. Anti-inflamatory 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.

DEUTSCH, V.R.; TOMER, A. Megakaryocyte development and platelet production. **Br. J. Haematol.,** Oxford, v.134, p.453-466, 2006.

DIEP, B.A.; CHAN, L.; TATTEVIN, P.; KAJIKAWA, O.; MARTIN, T.R.; BASUINO, L.; MAI, T.T.; MARBACH, H.; BRAUGHTON, K.R.; WHITNEY, A.R.; GARDER, D.J.; FAN, X.; TSENG, C.W.; LIU, G.Y.; BADIOU, C.; ETIENNE, J.; LINA, G.; MATTHAY, M.A.; DeLEO, F.R.; CHAMBERS, H.F. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., Washington, v.107, p.5587-5592, 2010.

EL-BENNA, J.; DANG, P.M..; GOUGEROT-POCIDALO, M.A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosporylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Semin. Immunopathol.**, Berlin, v.30, p.279-289, 2008.

ELBIM, C.; LIZARD, G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. **Cytometry A**., Hoboken, v.75, p.475-481, 2009.

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.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.34, p.229-237, 2001.

FRASCHINI, F.; SCAGLIONE, F.; DEMARTINI, G. Clarithromycin clinical pharmacokinetics. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v.25, p.189-204, 1993.

FUJIMURA, S.; SATO, T.; KIKUCHI, T.; ZAINI, J.; GOMI, K.; WATANABE, A. Efficacy of clarithromycin plus vancomycin in mice with implant-related infection caused by biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. **J. Orthop. Sci**., Tokyo, v.14, p.658-661, 2009.

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 administred late

in experimental pyelonephritis by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Infect. Dis**., London, v.6, p.31, 2006.

GILL, R.Q.; STERLING, R.K. Acute liver failure. **J. Clin. Gastroenterol.,** New York, v.33, p.191, 2001.

HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? **Trends Biochem. Sci**., Cambridge, v.31, p.509-515, 2006.

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.

HEIFETS, L.B. Clarithromycin against *Mycobacterium avium* complex infections. **Tuber. Lung Dis**., Edinburgh, v.77, p.19-26, 1996.

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.

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.

ISHIMATSU, Y.; KADOTA, J.; IWASHITA, T.; NAGATA, T.; ISHII, H.; SHIKUWA, C.; KAIDA, H.; MUKAE, H.; KOHNO, S. Macrolide antibiotics induce apoptosis of human peripheral lymphocytes in vitro. **Int. J. Antimicrob. Agents**., Amsterdan, v.24, p.247-253, 2004.

JAIN, A.; SANGAL, L.; BASAL, E.; KAUSHAL, G.P.; AGARWAL, S.K. Anti-inflammatory effects of erythromycin and tetracycline on Propionibacterium acnes induced production of chemotactic factors and reactive oxygen species by human neutrophils. **Dermatol. Online J**., Davis, v.8, p.2, 2002.

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.

KADIR, T.; IZZETIN, F.V.; CEVIKBAS, A.; JOHANSSON, C.B.; CLARK, P. In vitro effects of clarithromycin on human polymorphonuclear leukocyte functions. **Chemotherapy**., Basel, v.46, p.198-203, 2000.

KADOTA, J.; IWASHITA, T.; MATSUBARA, Y.; ISHIMATSU, Y.; YOSHINAGA, M.; ABE, K.; KOHNO, S. Inhibitory effect of erythromycin on superoxide anion production by human neutrophils primed with granulocyte-colony stimulating factor. **Antimicrob. Agents Chemother**., Washington, v.42, p.1866-1867, 1998.

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.

KERR, R.; NEWSOME, P.; GERMAIN, L.; THOMSON, E.; DAWSON, P.; STIRLING, D.; LUDLAM, C.A. Effects of acute liver injury on blood coagulation. **J. Thromb. Haemost.**, Oxford, v.1, p.754-759, 2003.

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.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 18.28-18.29; p. 18.80-18.81.

KRUPICZOJC, M.A.; SCOTTON, C.J.; CHAMBERS, R.C. Coagulation signalling following tissue injury: Focus on the role of factor Xa. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** Exeter, v.40, p.1228-1237, 2008.

LABRO, M.T. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? **Clin. Microbiol. Rev**., Washington, v.13, p.615-650, 2000.

LANBECK, P.; ODENHOLT, I.; RIESBECK, K. Dicloxacillin and erythromycin at high concentrations increase ICAM-1 expression by endothelial cells: a possible factor in the

pathogenesis of infusion phlebitis. **J. Antimicrob. Chemother**., London, v.53, p.174-179, 2004.

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.

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.

MACKMAN, N.; TILLEY, R.E.; KEY, N.S. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** Dallas, v.27, p. 1687-1693, 2007.

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.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, London, v.454, p.428-435, 2008.

MILLROSE, M.; KRUSE, M.; FLICK, B.; STAHLMANN, R. Effects of macrolides on proinflammatory epitopes on endothelial cells in vitro. **Arch. Toxicol**., Berlin, v.83, p.469-476, 2009.

MONROE, D.M.; KEY, N.S. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. **J. Thromb. Haemost.**, England, v.5, p.1097-1105, 2007.

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.

MUKAE, H.; URABE, K.; YANAGIHARA, K.; ISHIMOTO, H.; SAKAMOTO, N.; ISHII, H.; NAKAYAMA, S.; ISHIMATSU, Y.; ABE, K.; SHIRAI, R.; KOHNO, S. Low expression of T-cell co-stimulatory molecules in bone marrow-derived dendritic cells in a mouse model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. **Tohoku J. Exp. Med**., Sendai, v.220, p.59-65, 2010.

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

NG, P.C.; SO, K.W.; FUNG, K.S.; LEE, C.H.; FOK, T.F.; WONG, E.; WONG, W.; CHEUNG, K.L.; CHENG, A.F. Randomised controlled study of oral erythromycin for treatment of gastrointestinal dysmotility in preterm infants. **Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.**, London, v.84, p.177-182, 2001.

O'CONNOR, R.; O'SULLIVAN, J.F.; O'KENNEDY, R. The pharmacology, metabolism, and chemistry of clofazimine. **Drug Metab. Rev.**, New York, v.27, p.591-614, 1995.

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.

OLIVEIRA, J.N.; NETO, U.F. Insuficiência hepática aguda. **J. Elec. Ped. Gast. Nut. Liv. Dis.**, São Paulo, v.8, n.1, 2004.

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

PAINA, F.A.; QUEIROZ, R.H.; SOUZA, A.M. Hematological, hemostatic and biochemical alterations induced by clofazimine and clarithromycin, in single and multiple doses, in rats. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**., Uberaba, v.41, p.282-287, 2008.

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.

PHAM, C.T.N. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v.6, p.541-550, 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.

POLITI, F.A.S.; MAJEROWICZ, J.; CARDOSO, T.A.O.; PIETRO, R.C.L.R.; SALGADO, H.R.N. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**., Araraquara, v.29, p.17-28, 2008.

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.

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

QUINNEY, S.K.; ZHANG, X.; LUCKSIRI, A.; GORSKI, J.C.; LI, L.; HALL, S.D. Physiologically based pharmacokinetic model of mechanism-based inhibition of CYP3A by clarithromycin. **Drug Metab. Dispos**., Bethesda, v.38, p.241-248, 2010.

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.

REPO, H.; JANSSON, S.E.; LEIRISALO-REPO, M. Anticoagulant selection influences flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo and ex vivo. **J. Immunol. Methods**, Amsterdan, v.185, p.65-79, 1995.

RICHARDSON, M.P.; AYLIFFE, M.J.; HELBERT, M.; DAVIES, E.G. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. **J. Immunol. Methods.**, Amsterdan, v.219, p.187-193, 1998.

ROOS, D.; VAN BRUGGEN, R.; MEISCHL, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes Infect.**, Paris, v.5, p.1307-1315, 2003.

ROSZKOWSKI, K.; BEUTH, J.; KO, H.L.; PETERS, G.; PULVERER, G. Comparative study on the macrolides erythromycin and clarithromycin: antibacterial activity and influence on immune responses. **Zentralbl. Bakteriol**., Stuttgart, v.273, p.518-530, 1990.

SCAGLIONE, F.; FERRARA, F.; DUGNANI, S.; DEMARTINI, G.; TRISCARI, F.; FRASCHINI, F. Immunostimulation by clarithromycin in healthy volunteers and chronic bronchitis patients. **J. Chemother.**, Firenze, v.5, p.228-232, 1993.

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

SHEPPARD, R.F.; KELHER, M.R.; MOORE, E.E.; NATHAN, J.D.; MCLAUGHLIN, N.J.D.; BANERJEE, A.; SILLIMAN, C.C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. **J. Leukoc. Biol**., New York, v.78, p.1025-1042, 2005.

SHIRAI, T.; SATO, A.; CHIDA, K. Effect of 14-membered ring macrolide therapy on chronic respiratory tract infections and polymorphonuclear leukocyte activity. **Intern. Med**., Tokyo, v.34, p.469-474, 1995.

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.

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.

SON, K.A.; KANG, J.H.; YANG, M.P. Ketamine inhibits the phagocytic responses of canine peripheral blood polymorphonuclear cells through the upregulation of prostaglandin E2 in peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Res. Vet. Sci**., London, v.87, p.41-46, 2009.

SUGIHARA, E.; KOYANAGI, T.; NIZEKI, T.; HIROTA, N.; NAGAFUCHI, M.; YAMADA, K.; KIDO, Y.; ONO, N.; RIKIMARU, T.; AIZAWA, H. Macrolide antibiotics directly reduce active oxygen generation by neutrophils in human peripheral blood. **Kurume Med. J**., Kurume-shi, v.50, p.9-15, 2003.

SUKPANICHNANT, S.; HARGROVE, N.S.; KACHINTORN, U.; MANATSATHIT, S.; CHANCHAIRUJIRA, T.; SIRITANARATKUL, N.; AKARAVIPHTH, T.; THAKERNGPOL, K. Clofazimine-induced crystal-storing histiocytosis producing chronic abdominal pain in a leprosy patient. **Am. J. Surg. Pathol**., New York, v. 24, p.129-135, 2000.

SUGIE, M.; ASAKURA, E.; ZHAO, Y.L.; TORITA, S.; NADAI, M.; BABA, K.; KITAICHI, K.; TAKAGI, K.; TAKAGI, K.; HASEGAWA, T. Possible involvement of the drug transporters P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein Mrp2 in disposition of azithromycin. **Antimicrob. Agents Chemother**., Washington, v.48, p.809-814, 2004.

SUGIYAMA, K.; SHIRAI, R.; MUKAE, H.; ISHIMOTO, H.; NAGATA, T.; SAKAMOTO, N.; ISHII, H.; NAKAYAMA, S.; YANAGIHARA, K.; MIZUTA, Y.; KOHNO, S. Differing effects of clarithromycin and azithromycin on cytokine production by murine dendritic cells. **Clin. Exp. Immunol**., Oxford, v.147, p.540-546, 2007.

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.

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.

UMEKI, S. Anti-inflammatory action of erythromycin. Its inhibitory effect on neutrophil NADPH oxidase activity. **Chest**., Chicago, v.104, p.1191-1193, 1993.

VAN DE STOLPE, A.; VAN DER SAAG, P.T. Intercellular adhesion molecule-1. **J. Mol. Med**., Berlin, v. 74, p.13-33, 1996.

VENTAKESAN, K. Clinical pharmacokinetic considerations in the treatment of patients with leprosy. **Clin. Pharmacokinet**., New York, v.16, p.365-386, 1989.

VUORTE, J.; JANSSON, S.E.; REPO, H. Standardization of a flow cytometric assay for phagocyte respiratory burst activity. **Scand. J. Immunol**., Oxford, v.43, p.329-334, 1996.

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.

WEIGAND, M.A.; SCHMIDT, H.; ZHAO, Q.; PLASCHKE, K.; MARTIN, E.; BARDENHEUER, H.J. Ketamine modulates the stimulated adhesion molecule expression on human neutrophils in vitro. **Anesth. Analg**., Baltimore, v.90, p.206-212, 2000.

WENISCH, C.; PARSCHALK, B.; HASENHÜNDL, M.; WIESINGER, E.; GRANINGER, W. Effect of cefodizime and ceftriaxone on phagocytic function in patients with severe infections. **Antimicrob. Agents Chemother**., Washington, v.39, p.672-676, 1995.

WENISCH, C.; PARSCHALK, B.; ZEDTWITZ-LIEBENSTEIN, K.; WEIHS, A.; el MENYAWI, I.; GRANINGER, W. Effect of single oral dose of azithromycin, clarithromycin, and roxithromycin on polymorphonuclear leukocyte function assessed ex vivo by flow cytometry. **Antimicrob. Agents Chemother**., Washington, v.40, p.2039-2042, 1996.

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.

XU, G.; FUJITA, J.; NEGAYAMA, K.; OHNISHI, T.; MIYAWAKI, H.; HOIO, S.; TAKIGAWA, K.; OKADA, H.; YAMAII, Y.; TAKAHARA, J. Effect of clarithromycin on macrophage functions. **Kansenshogaku Zasshi**., Tokyo, v.69, p.864-872, 1995.

XU, G.; FUJITA, J.; NEGAYAMA, K.; YUUBE, K.; HOIO, S.; YAMAII, Y.; KAWANISHI, K.; TAKAHARA, J. Effect of macrolide antibiotics on macrophage functions. **Microbiol. Immunol**., Tokyo, v.40, p.473-479, 1996.

YANAGIHARA, K.; TOMONO, K.; SAWAI, T.; HIRAKATA, Y.; KADOTA, J.; KOGA, H.; TASHIRO, T.; KOHNO, S. Effect of clarithromycin on lymphocytes in chronic respiratory Pseudomonas aeruginosa infection. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**., New York, v.155, p.337-342, 1997.

YANO, T.; KASSOVSKA-BRATINOVA, S.; TEH, J.S.; WINKLER, J.; SULLIVAN, K.; ISAACS, A.; SCHECHTER, N.M.; RUBIN, H. Reduction of clofazimine by mycobacterial type 2 NADH:Quinone oxidoreductase: A pathway for the generation of bactericidal levels of reactive oxygen species. **J. Biol. Chem**., Baltimore, 2010.

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.

ZHANEL, G.G.; DUECK, M.; HOBAN, D.J.; VERCAIGNE, L.M.; EMBIL, J.M.; GIN, A.S.; KARLOWSKY, J.A. Review of macrolides and ketolides: focus on respiratory tract infections. **Drugs**., Auckland, v.61, p.443-498, 2001.

ZHOU, Z.Q.; YU, Y.Q.; FENG, S.W.; YU, M.; LIU, H.J.; YANG, J.J. Ketamine inhibits polymorphonuclear leucocyte CD11b expression and respiratory burst activity in endotoxemic rats. **Inflamm. Res**., Auckland, v.56, p.149-153, 2007.

ZILBERSTEIN, G.; LEVY, R.; RACHINSKY, M.; FISHER, A.; GREEMBERG, L.; SHAPIRA, Y.; APPELBAUM, A.; ROYTBLAT, L. Ketamine attenuates neutrophil activation after cardiopulmonary bypass. **Anesth. Analg**., Baltimore, v.95, p.531-536, 2002.

ZIMMERMANN, T.; LAUFEN, H.; RIEDEL, K.D.; TREADWAY, G.; WILDFEUER, A. Comparative tolerability of intravenous azithromycin, clarithromycin and erythromycin in healthy volunteers. **Clin. Drug Investig**., Auckland, v.21, p.527-536, 2001.

ANEXO

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA
CEUA
NO USO DE ANIMAIS

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

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 602 4469 – Fax: (16) 633 7964