

5 Discussão

O estudo clássico de dose letal 50% (DL₅₀) foi proposto por Trevan em 1927 (citado por BOTHAM, 2004) para estudar digitálicos e insulina, de uso conhecido em humanos, que utilizavam 100 animais de cada espécie, por produto. Em 1981, a *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) publicou orientações para estudos de toxicidade oral aguda (OECD 401), em que se preconizava a utilização de somente 5 animais por sexo para cada dose, sendo utilizadas três doses para cada produto, selecionando-as com base em estudos prévios ou dados históricos de efeitos tóxicos até o limite de 5000 mg/kg. Em 2001, foi publicada a OECD 420, alterando o limite do protocolo de doses fixas para 2000 mg/kg e o estudo deixou de ter como objetivo somente o percentual final das mortes, passando a avaliar, também, os sinais de toxicidade (VAN DEN HEUVEL, 1990; YAM, 1991; BOTHAM, 2004).

No presente estudo, foi então testada, inicialmente, a dose de 2000 mg/kg para os dois análogos e durante os estudos de toxicidade aguda do MTZ-Ms, não foi observada nenhuma morte dos animais como consequência da dose administrada. Além disso, nenhum sinal de toxicidade foi também observado durante o tempo de experimentação. Assim, essa droga se classifica na categoria 5 do *Globally Harmonized System for the Classification and Labeling of Chemicals*. Isto significa que a mesma apresenta baixo risco toxicológico agudo, mas que em certas circunstâncias pode oferecer perigo às populações vulneráveis.

No mesmo estudo com o MTZ-I na dose de 2000 mg/kg, os animais apresentaram intenso prurido além de ter sido detectada a morte de um animal. Desta forma tornou-se necessária a administração da dose de 300 mg/kg, segundo o protocolo da OECD nº 420. Como na dose de 300 mg/kg não foi observado nenhum sinal de toxicidade, esta droga se classifica na categoria 4 do *Globally Harmonized System for the Classification and Labeling*

of Chemicals significando que o fármaco apresenta riscos, para uma população, nas doses compreendidas entre 300 mg/kg e 2000 mg/kg (OECD 2001, UNITED NATIONS, 2005).

Para o metronidazol (MTZ) não foi feito estudo de toxicidade aguda uma vez que trata-se de um fármaco em uso a mais de 50 anos sendo, portanto, bem conhecidas as doses terapêuticas e as tóxicas. Conduzir testes de toxicidade aguda com este fármaco, já tão bem estudado, levaria a utilização desnecessária de animais, principalmente se levarmos em consideração que, atualmente, o maior desafio em estudos de toxicidade para produtos terapêuticos não é o de grandes dose em curto espaço de tempo e sim, o uso de múltiplas doses.

Conforme protocolos internacionais, o estudo de toxicidade em doses repetidas por 28 dias deverá ser conduzido a partir dos resultados dos testes de toxicidade aguda. Esse teste visa identificar o espectro de toxicidade cumulativa do produto, podendo ser descrito primeiramente, pelos órgãos alvo afetados, reversibilidade das lesões, avaliação dos parâmetros clínicos, além de ser fonte de informação das doses a serem estudadas nos testes de toxicidade sub-crônica e crônica onde os períodos de administração são de 90 e 180 dias, respectivamente (OECD, 1995).

As observações clínicas diárias dos animais nos testes de toxicidade aguda são também importantes para o direcionamento da escolha das doses utilizadas nos estudos de toxicidade em doses repetidas, visto que a seleção dessas doses é um ponto crítico (JANBAZ *et al.*, 2002; ALVAREZ-GUERRA *et al.*, 2003; HASUMURA *et al.*, 2004; FERES *et al.*, 2006). Essas, devem ser maiores que a dose sugerida para uso em humanos, em média 10 vezes (EATON & KLASSEN 1996), assim como aquelas avaliadas em animais, onde intervalos de duas a quatro vezes entre as mesmas são considerados adequados, sendo que a maior dose deve ser escolhida com o objetivo de induzir toxicidade mas não a morte ou sofrimento

severo dos animais e a menor dose não deverá apresentar efeitos adversos (OECD 407, 1995).

Levando-se em consideração que a dose terapêutica média para humanos de MTZ é de 60 mg/kg e que segundo Sohni et al. (1995) a dose de 200 mg/kg de MTZ foi eficaz no tratamento de amebíase em ratos, no presente estudo foram selecionadas as doses de 200, 400 e 600 mg/kg para o MTZ e MTZ-I, para o MTZ-Ms foi escolhida uma única dose de 1000 mg/kg, dose limite para este teste, uma vez que não seria esperado o aparecimento de efeitos adversos em doses inferiores (OECD 407, 1995).

Na avaliação clínica diária dos animais estudados, foi observado intenso prurido nos grupos tratados com MTZ-I, porém reversível após período de 24 h. A reversibilidade de um efeito tóxico demonstra a capacidade de reação do organismo ao mesmo, dependendo do órgão e da localização em que foi afetado e também a intensidade em que o efeito ocorreu. Existem órgãos com grandes diferenças na capacidade regenerativa de suas células, como, por exemplo, o fígado. Outros apresentam baixa capacidade de regeneração, como o sistema nervoso central (EATON E KLASSEN, 1996; OGA, 2003).

Segundo o Programa Nacional de Toxicologia (NTP) dos Estados Unidos é importante que os animais sobreviventes não percam mais do que 10% do seu peso corporal inicial (EATON & KLASSEN 1996). A perda de peso é um indicativo de efeitos tóxicos (RAZA *et al.* 2002, TEO *et al.* 2002). Na avaliação do peso corporal dos animais, nas doses estudadas, para todos os fármacos, as diferenças observadas quanto ao sexo e quanto ao período de exposição estão de acordo com os dados fisiológicos dos animais.

Em relação ao consumo de ração houve redução no grupo tratado com MTZ-I. Por outro lado, no consumo de água não foi verificada nenhuma alteração significativa. A determinação do consumo de ração e água é muito importante nos estudos de segurança de produtos com finalidade terapêutica, uma vez que a ingestão adequada de água e ração são essenciais para a

manutenção fisiológica do animal e para se obter resposta adequada ao produto testado; e não uma “falsa” resposta, devido às condições nutricionais inadequadas (STEVENS & MYLECRAINE 1994, IVERSEN & NICOLAYSEN 2003).

Jenkins and Hidioglou (1990) observaram diminuição do ganho peso em bezerros submetidos ao tratamento com um composto iodado, o etilenodiaminodihidriodo. Assim, no presente estudo, o fato de o grupo tratado com MTZ-I ter menor ganho de peso quando comparado ao controle é condizente com menor consumo de ração e ingestão de compostos contendo iodo.

Entretanto, as observações clínicas diárias são consideradas de fundamental importância assim como as observações finais (STEVENS & MYLECRAINE 1994, EATON & KLASSEN, 1996). O comportamento dos animais tratados com MTZ e MTZ-Ms não apresentou alteração em relação ao grupo controle. No entanto, nos tratados com MTZ-I foi observada irritabilidade irreversível em todas as doses no decorrer do experimento.

Quanto aos resultados da avaliação bioquímica de todas os fármacos estudados, foram observadas alterações dose-dependentes para alguns parâmetros. No grupo tratado com MTZ, observou-se elevação dos níveis de TGO mas no entanto não foi observada nenhuma alteração macroscópica ou histopatológica do fígado indicando que a alteração encontrada não apresenta significado clínico (YUAN, 2006).

A avaliação da hepatotoxicidade é importante na terapia medicamentosa; visto que é o principal órgão responsável pelas reações de biotransformação dos xenobióticos (ANGOSTO & GÓMEZ-LECHÓN, 2004). Vale ressaltar, porém, que a hepatotoxicidade apresenta baixo valor preditivo quando comparada aos humanos. Os biomarcadores de hepatotoxicidade são relativamente insensíveis em animais, porém, essa correlação é aumentada quando estudos de histopatologia são realizados (OLSON *et al.*, 2000)

No grupo tratado com MTZ-Ms, os valores de transaminase glutâmico pirúvica (TGP) apresentaram-se elevados quando comparados com o grupo controle e acima dos valores de referência. Apesar da massa do fígado dos machos ter sido maior que o grupo controle, nenhuma, nenhuma alteração histopatológica foi observada, sugerindo não haver significado clínico uma vez que níveis elevados de TGO e TGP apresentam excelente correlação com a necrose severa do tecido hepático (FUJII, 1997).

A hepatomegalia pode ter várias causas como infecções, neoplasias, cirrose, distúrbios metabólicos genéticos, uso de fármacos ou toxinas que poderiam aumentar a proliferação celular hepática. Entretanto, a comparação com análises histopatológicas é de fundamental importância (AMACHER *et al.*, 2005). Considerando que nenhuma alteração histopatológica foi observada, no presente estudo, sugerimos verificação desse fato em roedores.

Em todos os grupos tratados com MTZ, MTZ-I e MTZ-Ms, foi observado aumento do colesterol total, apresentando resultados acima dos valores de referência. Nossos resultados estão de acordo com aqueles observados por Sanyal *et al* (1992) que também verificaram elevação do colesterol em ratos tratados com MTZ na dose de 100 mg/kg por um período de 7 dias.

Cabe ressaltar que, em estudos, conduzidos em humanos, foi observado o oposto, ou seja, diminuição do colesterol total dos indivíduos tratados com MTZ (SHAMKHANI *et al.*, 2003; JENKINS *et al.*, 2005). Esses dados indicam que esse parâmetro apresenta baixo valor preditivo e que, caso o estudo desses fármacos avancem para estudos clínicos, tal efeito deverá ser verificado.

Houve elevação também nos níveis de uréia no grupo tratado com MTZ-I, na dose de 600 mg/kg. A uréia é um marcador de função hepática (KANEKO *et al.*, 1997), o que poderia sugerir alteração na permeabilidade celular dos hepatócitos. Porém, não foram observadas

alterações histopatológicas em nenhum órgão estudado, sugerindo não haver significado clínico.

Na avaliação dos parâmetros hematológicos não foi verificada diferença no grupo tratado com MTZ-I. Por outro lado, nos grupos tratados com MTZ e MTZ-Ms foi observado aumento significativo dos leucócitos, linfócitos e hemácias em todas as doses. O aumento de linfócitos foi também observado, após tratamento com MTZ, em estudos pré-clínicos (SHUBERT, 1996) e clínicos (BAHR, 1996). Elizondo *et al.* e Menéndez *et al.*(2001), observaram ainda que o aumento na taxa da proliferação dos linfócitos ocorre ao mesmo tempo que se observam aberrações cromossômicas.

No presente estudo, foi observado processo apoptótico tanto nas placas de Payer quanto no baço dos animais tratados com os três fármacos. De acordo com Hartwell & Kastan (1994) e Elledge (1996) a morte das células por apoptose é um mecanismo de defesa das mesmas, quando são detectadas aberrações no DNA, fazendo com que o ciclo celular seja interrompido.

Dessa forma, pode-se sugerir que o aumento da proliferação dos linfócitos poderia ser um mecanismo compensatório devido às aberrações cromossômicas encontradas nas células. Isso poderia explicar o fato do MTZ-I ter se mostrado mais tóxico do que o MTZ e MTZ-Ms, uma vez que não foi observado aumento da proliferação de linfócitos nos grupos tratados com esse fármaco.

Outros estudos, conduzidos em humanos tratados com MTZ na dose terapêutica, demonstraram aumento do número de aberrações cromossômicas e quebra do DNA dos linfócitos de humanos tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo então observada uma situação inesperada, o aumento da proliferação dos linfócitos e ao mesmo tempo a quebra do DNA dessas células, levando a célula alterada à apoptose (ELLEGE, 1996; MENÉNDEZ, 2001).

A partir dos dados da literatura e do presente estudo, grande importância terão os parâmetros hematológicos em estudos em não roedores, visto que o sistema hematológico é importante alvo de estudos pré-clínicos em animais, pelo seu elevado valor preditivo (91%) para toxicidade humana, principalmente quando os estudos são realizados em roedores e não roedores, por um período superior a um mês (OLSON *et al.*, 2000).

O desenvolvimento de uma resposta imune e inflamatória à uma infecção parece ser o pivô de diversas patologias causadas por *H. pylori* como gastrite crônica, úlcera péptica e carcinoma gástrico (European Helicobacter Study Group 1997; PORTAL-CELHAY & PEREZ-PEREZ 2006). Segundo Elizondo *et al.* (1994) o aumento da velocidade de proliferação dos linfócitos indica possível efeito imunoestimulatório em pacientes sob terapia com MTZ. Assim, o aumento de linfócitos e a hiperplasia das placas de Peyer, observados no presente trabalho, reforçam a hipótese de que a ação do MTZ sobre *H. pylori* é, além do seu potencial de redução e caráter hidrofóbico conforme preconizado por Busatti (2006), também o de imunoestimulação do hospedeiro.

Na avaliação histopatológica, foi verificado, ainda, nos grupos tratados com MTZ na dose de 600 mg/kg e MTZ-Ms na dose de 1000 mg/kg, a destruição das células germinativas do aparelho reprodutor masculino e atresia folicular das fêmeas. Esse efeito já foi verificado por El-Nahas e El-Ashmawy (2004), onde, utilizando MTZ na dose de 500 mg/kg por 14 dias, também observaram diminuição da massa dos testículos, contagem e morfologia anormal dos espermatozoides e degeneração dos túbulos seminíferos. McClain *et al.* (1998) também observaram que a dose de 400 mg/kg/dia, durante seis semanas de tratamento, causou infertilidade de ratos sendo esse efeito reversível após oito semanas de cessado o tratamento.

A partir desses dados, pode-se observar que os análogos estudados possuem potencial para promover toxicidade, quando administrados em doses 2 vezes superior à dose eficaz (200 mg/kg) em animais, o que, evidentemente, não invalida a sua utilização, visto que o emprego

de um produto terapêutico se baseia em um contexto mais amplo. Assim, é na avaliação do risco que se estabelece a possibilidade do aparecimento de um evento tóxico.

Portanto, a avaliação do risco de produtos farmacêuticos é mais estudada devido às suas condições de uso serem mais facilmente monitoradas em relação aos agrotóxicos ou contaminantes ambientais, por exemplo, que não possuem exposição determinada. Produtos farmacêuticos são rotineiramente avaliados, principalmente durante a triagem clínica, pois permitem a avaliação de possíveis riscos levantados na fase pré-clínica, baseando-se na exposição relativa e nos efeitos (STEVENS & MYLECRAINE, 1994).

Normalmente, o processo de manejo do risco dos xenobióticos consiste em quatro etapas (STEVENS & MYLECRAINE, 1994; DESCOTES, 2003). A primeira é a identificação do risco, em que a comparação de dados clínicos e aqueles obtidos em animais podem ser usados, em várias ocasiões, em casos de uso inadvertido em pacientes ou voluntários, que são expostos a altas doses de determinado xenobiótico (STEVENS & MYLECRAINE, 1994).

A segunda etapa é a avaliação da relação dose-resposta, a partir da interação de resultados de estudos pré-clínicos e dados clínicos. A terceira consiste na avaliação da exposição, que não pode ser feita apenas pela determinação do xenobiótico em fluidos biológicos. Devem ser determinados através dos biomarcadores, sendo essa fase de extrema importância. A identificação e validação dos biomarcadores requerem a interação entre pesquisa científica, estudos em animais e clínicos (STEVENS & MYLECRAINE, 1994; DESCOTES, 2003).

A quarta e última fase é a de caracterização do risco, com base nos dados obtidos nas fases anteriores, associados aos fatores de incerteza e dados epidemiológicos, que podem auxiliar em relação à exposição humana ao xenobiótico, quando existir. Para isso, necessita-se incluir dados clínicos mais extensivamente (STEVENS & MYLECRAINE, 1994; DESCOTES, 2003).

Nesse contexto, a análise de todos os resultados obtidos no presente estudo deve ser realizada conjuntamente para melhor interpretação dos dados, visto que a eficácia dos análogos MTZ-MS e MTZ-I ficou comprovada nos testes *in vitro* realizados por Busatti *et al.* (2006).

Concluindo, considerando os resultados obtidos neste estudo em relação à imunoestimulação e também aqueles observados por Elizondo *et al.* (1994) e Menéndez *et al.* (2001), *in vivo* e *in vitro*, o aumento da taxa de proliferação dos linfócitos poderia ser um mecanismo compensatório devido às aberrações cromossômicas observadas nas células. Poderíamos sugerir estudos adicionais de MTZ e MTZ-Ms para verificação mais detalhada desse efeito. Considerando também que o MTZ-I mostrou atividade contra cepas resistentes de *H pylori* ao MTZ (Cavalcanti *et al.* 2004), porém, no presente estudo, apresentou baixa segurança nas condições estipuladas; e que o MTZ-Ms, apesar de segurança similar ao MTZ, no presente estudo, e maior atividade *in vitro* que o MTZ (BUSATTI *et al.* 2006), não foi testado para cepas resistentes ao MTZ, podemos sugerir que esse fármaco seja submetido a esses testes para avaliação de sua atividade, visto que o mesmo apresentou maior segurança nas condições experimentais utilizadas. Ressaltamos, porém, que a hepatomegalia, observada nos machos, deva ser considerada nos estudos posteriores.