

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

ALISSON RODRIGO DA SILVA OLIVEIRA

**ESTUDO TOXICOLÓGICO NÃO-CLÍNICO DE NOVOS
PROTÓTIPOS DERIVADOS DA
TIOSEMICARBAZONA (LpQM9 e LpQM11) COM
ATIVIDADE ANTI-CHAGÁSICA**

ALISSON RODRIGO DA SILVA OLIVEIRA

**ESTUDO TOXICOLÓGICO NÃO-CLÍNICO DE NOVOS
PROTÓTIPOS DERIVADOS DA
TIOSEMICARBAZONA (LpQM9 e LpQM11) COM
ATIVIDADE ANTI-CHAGÁSICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristima Lima Leite

Co-orientador: Prof. Dr. Lécio Leone de Almeida

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

O48e Oliveira, Alisson Rodrigo da Silva.
Estudo toxicológico não-clínico de novos protótipos derivados da tiossemicarbazona (LpQM9 e LpQM11) com atividade anti-chagásica / Alisson Rodrigo da Silva Oliveira. – Recife: o autor, 2018.
68 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
Inclui referências.

1. Doença de Chagas. 2. Toxicidade. 3. Dose repetida. I. Wanderley, Almir Gonçalves. (orientador). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 210)

ALISSON RODRIGO DA SILVA OLIVEIRA

**ESTUDO TOXICOLÓGICO NÃO-CLÍNICO DE NOVOS
PROTÓTIPOS DERIVADOS DA
TIOSEMICARBAZONA (LpQM9 e LpQM11) COM
ATIVIDADE ANTI-CHAGÁSICA**

Data da Aprovação: 15/03/2018

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Paulo André Teixeira de Moraes
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (Avaliador Interno)

Dr. David Filipe de Santana
Centro Acadêmico de Vitória – CAV/UFPE (Avaliador Externo)

Prof. Dr. Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho
Centro Universitário do Vale do Ipojuca – UNIFAVIP (Suplente Externo)

Prof. Dr. Danilo Galindo Bedor
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (Suplente Interno)

Dedico este trabalho à minha esposa Isabela Barbosa e ao meu filho Theo, em retribuição a todo apoio incondicional, incentivo e compreensão nos momentos de ausência. Vocês são o meu combustível para trilhar o caminho dos sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por todas as conquistas alcançadas, força nos momentos difíceis e coragem para prosseguir em meio as dificuldades.

Agradeço ao meu Orientador Almir Wanderley, pois além de todo o suporte acadêmico, foi muito paciente e compreensivo durante toda esta etapa. Serei muito grato por toda a ajuda e incentivo, professor.

Aos meus Co-orientadores Ana Cristina e Lécio Leone, por todo o suporte oferecido e compromisso para que este trabalho fosse possível.

Agradeço à minha esposa Isabela Barbosa por todo seu companheirismo e por ter sido uma coluna para me sustentar nos momentos de dificuldade. Passamos por muitas coisas juntos nesses últimos tempos, mas o nosso amor suportou tudo e nos deixou mais fortes. Que o nosso caminho seja duradouro e que Deus continue nos abençoando, te amo.

Ao meu filhinho amado, Theo, que chegou durante esse percurso e trouxe consigo muita força para o papai continuar seguindo seus sonhos.

Agradeço aos meus pais: José Marquiel e Ana Maria, Avós: Duda e Maria, minha irmã Nathalia e toda a minha família por todo amor, incentivo, carinho e dedicação. Amo vocês.

Por todo apoio recebido dos colegas do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-clínica de Produtos Bioativos, Laboratório de Etnofarmacologia Aplicada e BIOFARMATOX, em especial as minhas amigas Samara, Simone e Cynthia por todo incentivo, amizade e ensinamentos recebidos.

Aos professores, funcionários e colegas da Pós-graduação por toda amizade e momentos de descontração, em especial aos amigos Wellinton e Fatinha, que sempre me receberam de braços abertos e dispostos para me escutar e ajudar.

Aos meus amigos Karen, Anekécia, Giselle, Andreza, Camilla, Joanellys, Jackellyne, Paula, Sérgio, Paloma, Matheus, Renato e David por sempre estarem presentes e acreditarem em mim, vocês também são minha família.

Agradeço ao CNPq pelo importante subsídio recebido durante esta etapa.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Todos foram fundamentais e serei eternamente grato.

RESUMO

A doença de Chagas destaca-se como um grave problema de saúde pública e que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, o problema é agravado, uma vez que o único fármaco disponível para o manejo terapêutico da doença é o benznidazol. Mesmo assim, esse fármaco é considerado pouco eficaz para o estágio crônico da doença particularmente por estar associado a efeitos colaterais severos. Dentro desse contexto, o desenvolvimento de novos fármacos anti-Chagásicos é uma necessidade emergencial. Estudos recentes de protótipos derivados de tiossemicarbazonas (LpQM9 e LpQM11) revelaram potente atividade *in vitro* e *in vivo* frente a forma tripomastigota e amastigota do *Trypanosoma cruzi*. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade não-clínica destes protótipos. Para a realização deste trabalho, foram realizados testes de toxicidade aguda e de doses-repetidas (28 dias) em camundongos Swiss de ambos os sexos. No ensaio de toxicidade aguda (DL50), a dose de 1 g/kg por via oral não produziu alterações na homeostasia ou mortes em camundongos. Nos testes de toxicidade de doses repetidas por 28 dias, os protótipos LpQM9 e LpQM11 (30, 100 e 300 mg/kg) produziram apenas variações pontuais nos indicadores hematológicos e bioquímicos, no entanto, permaneceram dentro dos parâmetros de referência para a espécie estudada. Algumas alterações também foram encontradas na análise morfológica microscópica dos fígados e rins dos animais, no entanto, as funções hepática e renal foram preservadas, evidenciadas pelos marcadores bioquímicos. Dessa forma, conclui-se que os protótipos LpQM9 e LpQM11 por via oral possuem baixa toxicidade em camundongos Swiss de ambos os sexos, o que demonstra serem compostos promissores para futuros ensaios clínicos.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Toxicidade. Dose Repetida.

ABSTRACT

Chagas disease stands out as a serious public health problem and affects millions of people around the world. In Brazil, the problem is aggravated, since it is a single drug for the therapeutic management of the disease and benznidazole. Even so, this drug is poorly effective for the chronic stage of the disease particularly because it is associated with severe side effects. Given this scenario, the development of new anti-Chagas drugs is an emergency need. Recent studies of prototypes derived from thiosemicarbazones (LpQM9 and LpQM11) revealed potent in vitro and in vivo activity against the trypomastigote and amastigote form of *Trypanosoma cruzi*. Therefore, the objective of this study was to evaluate the non-clinical toxicity of these prototypes. For the accomplishment of this work, tests of acute toxicity and dose-repeated (28 days) in Swiss mice of both sexes were carried out. In the acute toxicity test (LD50), the oral dose of 1 g/kg did not produce changes in homeostasis or deaths in mice. In repeated dose toxicity tests for 28 days, the prototypes LpQM9 and LpQM11 (30, 100 and 300 mg/kg) produced only slight variations in the hematological and biochemical indicators, however, they remained within the reference parameters for the species studied. Some alterations were also found in the microscopic morphological analysis of the livers and kidneys of the animals; however, the hepatic and renal functions were preserved, evidenced by biochemical markers. Thus, it is concluded that the oral LpQM9 and LpQM11 prototypes have low toxicity in Swiss mice of both sexes, which proves to be promising compounds for future clinical trials.

Key words: Chagas disease. Toxicity. Repeat Dose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição de casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> , com base nas estimativas oficiais e no status da transposição de vetores.	17
Figura 2	<i>Triatoma infestans</i> (barbeiro), principal vetor da doença de Chagas.	17
Figura 3	Ciclo biológico da doença de Chagas	18
Figura 4	Efeito do LpQM9 sobre o consumo de água de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados por via oral durante 28 dias consecutivos.	29
Figura 5	Efeito do LpQM11 sobre o consumo de água de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados por via oral durante 28 dias consecutivos.	30
Figura 6	Efeito do LpQM9 sobre o consumo de ração de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados por via oral durante 28 dias consecutivos.	31
Figura 7	Efeito do LpQM11 sobre o consumo de ração de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados por via oral durante 28 dias consecutivos	32
Figura 8	Efeito do LpQM9 sobre o ganho de massa corporal de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados por via oral durante 28 dias consecutivos	33
Figura 9	Efeito do LpQM11 sobre o ganho de massa corporal de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados por via oral durante 28 dias consecutivos	34
Figura 10	Fotomicrografias do fígado de camundongos machos dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM9 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).	51
Figura 11	Fotomicrografias dos rins de camundongos machos dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM9 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).	52

Figura 12	Fotomicrografias do fígado de camundongos fêmeas dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM9 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).	53
Figura 13	Fotomicrografias dos rins de camundongos fêmeas dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM9 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).	54
Figura 14	Fotomicrografias do fígado de camundongos machos dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM11 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).	55
Figura 15	Fotomicrografias dos rins de camundongos machos dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM11 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).	56
Figura 16	Fotomicrografias do fígado de camundongos fêmeas dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM11 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).	57
Figura 17	Fotomicrografias dos rins de camundongos fêmeas dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM11 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).	58

/

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Efeito do LpQM9 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos tratados por via oral durante 28 dias consecutivos. 36
- Tabela 2** – Efeito do LpQM9 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos. 37
- Tabela 3** – Efeito do LpQM11 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos tratados por via oral durante 28 dias consecutivos. 38
- Tabela 4** – Efeito do LpQM11 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos. 39
- Tabela 5** – Efeito do LpQM9 sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss machos tratados por via oral durante 28 dias consecutivos. 41
- Tabela 6** – Efeito do LpQM9 sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos. 42
- Tabela 7** – Efeito do LpQM11 sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss machos tratados por via oral durante 28 dias consecutivos. 43
- Tabela 8** – Efeito do LpQM11 sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos. 44
- Tabela 9** – Efeito do LpQM9 sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de camundongos Swiss machos tratados por via oral durante 28 dias consecutivos. 46

Tabela 10	Efeito do LpQM9 sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos.	47
Tabela 11	Efeito do LpQM11 sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de camundongos Swiss machos tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos.	48
Tabela 12	Efeito do LpQM11 sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
CEUA	Comitê de Ética e Uso Animal
CHCM	Hemoglobina Corpuscular Média
DL₅₀	Dose Letal 50%
DNDI	Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DTNB	5,5` ditiobis (2-ácido nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EMA	European Medicines Agency
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GGT	Gama glutamil transferase
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
ICH	Internacional Conference Harmonisation
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
MSF	Organização Médicos Sem Fronteiras
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
RDW	Amplitude Corpuscular Média
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos
VCM	Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	A doença de Chagas.....	16
2.2	Desenvolvimento de novas drogas anti-chagásicas.....	19
2.3	Avaliação toxicológica.....	21
3	OBJETIVOS	23
3.1	Geral.....	23
3.2	Específicos.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Animais.....	24
4.2	Avaliação toxicológica.....	24
4.2.1	Toxicidade aguda.....	24
4.2.2	Toxicidade de dose-repetida (28 dias).....	25
4.2.3	Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	25
4.2.4	Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	26
4.2.5	Análise macroscópica dos órgãos.....	26
4.2.6	Análise histopatológica.....	26
4.3	Análise estatística.....	27
5	RESULTADOS	28
5.1	Toxicidade aguda.....	28
5.2	Toxicidade de dose repetida.....	28
5.3	Parâmetros hematológicos.....	35
5.4	Parâmetros bioquímicos.....	40
5.5	Morfologia macroscópica.....	45
5.6	Análise histopatológica.....	50
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem dedicado grande atenção às doenças negligenciadas, dentre as quais, a doença de Chagas destaca-se como um grave problema de saúde pública e que afeta milhões de pessoas em todo o mundo (COURA, 2007). Esta enfermidade é uma doença tropical parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, o qual é transmitido por meio de um inseto hematófago triatomíneo, através das suas fezes infectadas (CDC, 2017).

A doença de Chagas compreende uma fase aguda e outra crônica. A fase aguda compreende sinais como febre e inflamação e pode durar até 8 semanas, no entanto, a fase crônica pode persistir durante toda a vida do hospedeiro e levar a complicações graves, como miocardiopatia dilatada e em casos mais graves, até a morte (MARIN-NETO, 2010).

Considerada endêmica em países latino-americanos, a doença de Chagas se destaca como um importante problema de saúde pública (PÉREZ-MOLINA, 2017). No Brasil, o problema é agravado, uma vez que o único fármaco disponível para o manejo terapêutico da doença é o benznidazol (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Apesar de resultados efetivos na fase aguda da doença, este fármaco está associado a um longo tratamento. Além disso, esse fármaco é considerado pouco eficaz para o estágio crônico da doença particularmente por estar associado a efeitos colaterais severos (SOSA ESTANI, 2006).

Segundos dados recentes da Food and Drug Administration (FDA, 2017), além dos efeitos adversos já conhecidos como erupções cutâneas, náuseas e contagem anormal de glóbulos brancos, foi descoberto, por meio de estudos não-clínicos, que o benznidazol pode causar dano fetal quando administrado durante a gestação, fator que restringe o tratamento nessa população. Estudos adicionais mostraram a capacidade do benznidazol em causar dano hepático e estresse oxidativo (PEDROSA, 2001). Diante deste cenário, o desenvolvimento de novos protótipos a fármacos anti-Chagásicos é uma necessidade emergencial.

Compostos derivados das Aril-tiossemicarbazonas e Aril-4-tiazolil-hidrazonas são promissores agentes anti-Chagásicos (LIMA LEITE, 2006). Em estudo recente, os protótipos derivados de Aril-4-tiazolil-hidrazonas, denominados LpQM9 e LpQM11, produziram importante atividade *in vitro* e *in vivo* frente a diferentes formas evolutivas do parasito do *T. cruzi* (OLIVEIRA FILHO, 2015). No entanto, a segurança de uso *in vivo* destes protótipos ainda não foi estabelecida.

Diante do exposto, tendo em vista que o único fármaco disponível para o tratamento da doença de Chagas não apresenta eficácia contra as diferentes fases da doença e apresenta variados efeitos colaterais, considera-se importante à pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos com maior efetividade e menor toxicidade. Sendo assim, considerando a relevância desta investigação, este estudo pretende estabelecer as bases científicas e avaliar a possível toxicidade não-clínica dos protótipos com atividade anti-Chagásica (LpQM9 e LpQM11) a fim de determinar a sua segurança do uso.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A doença de Chagas

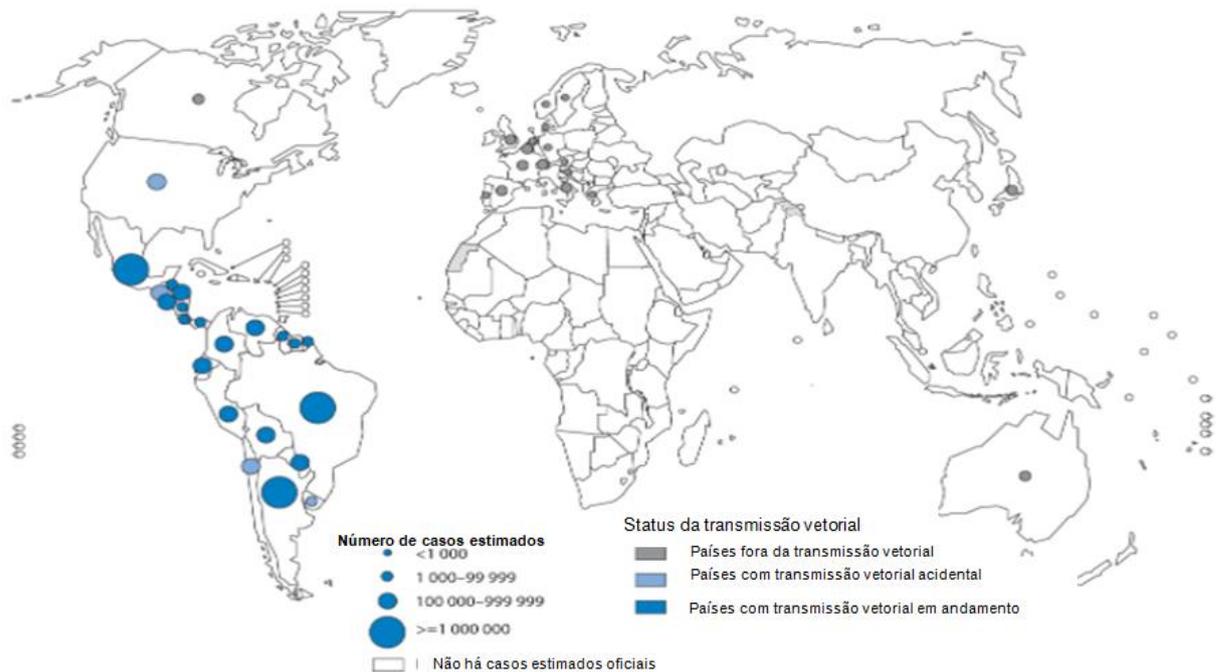
A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma antroponose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. No século XX, essa doença foi totalmente descrita, desde o seu agente causador, ciclo evolutivo e vetor, por um pesquisador brasileiro chamado Carlos Chagas, sendo considerado um feito único na história da medicina até os dias atuais (FIOCRUZ, 2017).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que existam cerca de 6-7 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* em todo o mundo (Figura 1), sendo considerada uma doença tropical negligenciada (OMS, 2017). Doenças negligenciadas são aquelas causadas por agentes infecciosos ou parasitas e são consideradas endêmicas em populações de baixa renda e ainda apresentam indicadores inaceitáveis e investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos e em seu controle (FIOCRUZ, 2017). As doenças tropicais, como a doença de Chagas, a malária, a doença do sono (tripanossomíase humana africana, THA), a leishmaniose visceral (LV), a filariose linfática, a dengue e a esquistossomose continuam sendo algumas das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (OMS, 2017).

Apesar de ter sido descoberta há mais de 100 anos, a doença de Chagas ainda é considerada endêmica em países latino-americanos, sendo considerado um importante problema de saúde pública (PÉREZ-MOLINA, 2017).

No entanto, países desenvolvidos, como os Estados Unidos da América, também são acometidos pela doença de Chagas, segundo dados da FDA, estima-se que cerca de 300 mil pessoas estão infectadas com o protozoário no país e considera a migração um importante fator para disseminação da doença através das fronteiras geográficas (FDA, 2017).

Figura 1. Distribuição de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*, com base nas estimativas oficiais e no status da transposição de vetores.



Fonte: OMS, 2010 (adaptado).

O *T. cruzi* é transmitido por insetos da família Reduviidae, principalmente dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, sendo o *Triatoma infestans* (Figura 2), mais conhecido como barbeiro, a principal espécie vetora desta doença (CDC, 2012). No entanto, a doença de Chagas pode ser transmitida por transfusão sanguínea, contaminação vertical ou através do aleitamento materno (SANTOS, 2003).

Figura 2. *Triatoma infestans* (barbeiro), principal vetor da doença de Chagas.

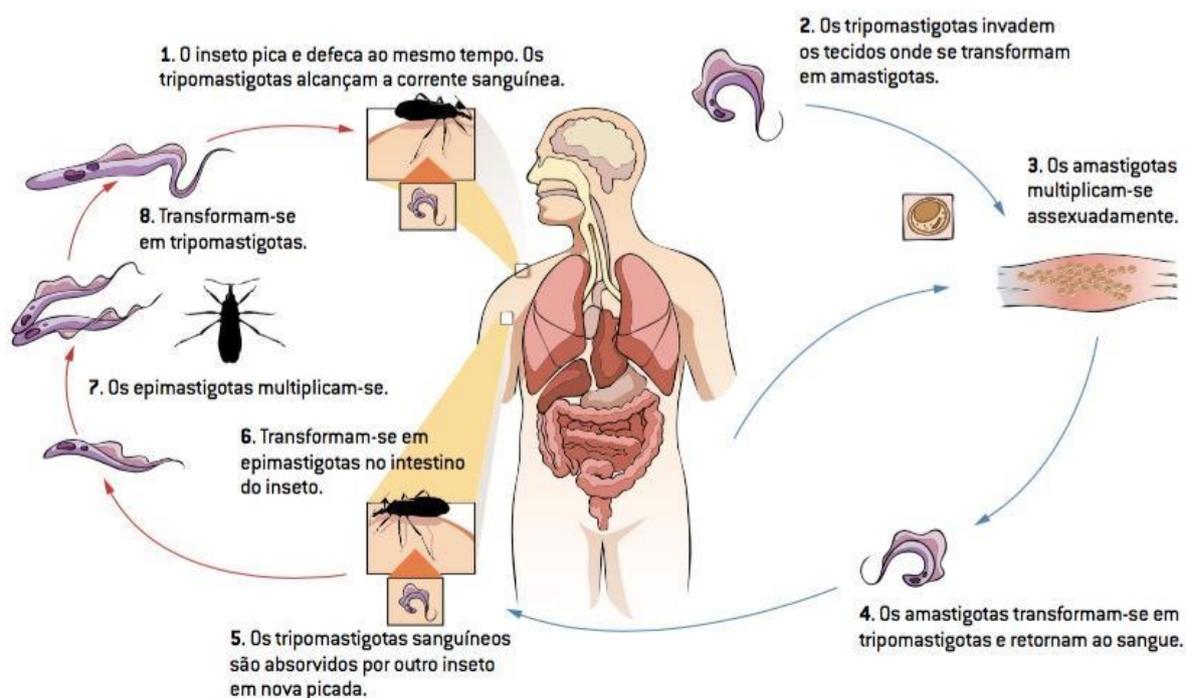


Fonte: Minden pictures, 2015.

O ciclo de vida deste parasito é do tipo heteroxênico, multiplicando-se no meio intracelular no hospedeiro vertebrado e no extracelular no intestino do vetor invertebrado (Figura 3). A transmissão do protozoário pelo inseto ocorre no momento do repasto sanguíneo, onde o triatomíneo libera as fezes

infectadas com as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, que podem invadir através do local da picada ou mucosa. Após sua entrada, as tripomastigotas parasitam várias células do hospedeiro e se biotransformam nas formas amastigotas, as quais são responsáveis pela multiplicação assexuada no homem e aumento da carga parasitária, pois podem novamente se transformar em tripomastigotas que irão destruir as células e invadir a corrente sanguínea, podendo infectar novos tecidos ou até ser ingeridas por um inseto vetor. No inseto, ocorre uma transformação para a forma de reprodução assexuada, denominada epimastigota e posteriormente para a tripomastigota, sua forma infectante (PAL, 2011).

Figura 3. Ciclo biológico da doença de Chagas



Fonte: CDC, 2017.

A doença de Chagas compreende uma fase aguda, que pode ser assintomática, e outra crônica. A fase aguda, que dura de 4-8 semanas, pode apresentar sinais e sintomas que incluem febre, dores musculares, vômitos, diarreia, inflamação no local da inoculação, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (LARANJA, 1956; MARIN-NETO, 2010). Em indivíduos imunocompetentes, a carga parasitária diminui até níveis não detectáveis, no entanto, caso o parasita não tenha sido completamente eliminado, a doença pode entrar na fase crônica, cuja duração pode persistir durante toda a vida do hospedeiro (RASSI, 2010).

A fase crônica da doença de Chagas também pode ser assintomática, no entanto, podem apresentar quadros de doenças graves e até levar à morte. Algumas alterações patológicas são clássicas nessa fase, tais como: megacólon, megaesôfago e miocardiopatia dilatada (MARIN-NETO, 2010). As complicações cardíacas são as mais frequentes, mais graves e a principal causa de morte em pacientes infectados pelo *T. cruzi* (RASSI, 2001).

O tratamento para a fase aguda da doença de Chagas já está bem estabelecido, no entanto, há controvérsias sobre a efetividade na fase crônica (PÉREZ-MOLINA, 2009). Atualmente, o benznidazol é o único fármaco disponível para o tratamento desta doença e está inserido na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), classificado como medicamento estratégico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

No entanto, além da pouca efetividade na fase crônica da doença, o benznidazol apresentou vários efeitos adversos, tais como: hipersensibilidade, mialgia, intolerância digestiva, anorexia e depressão da medula óssea (SOSA ESTANI, 2013). Além disso, estudos pré-clínicos reprodutivos recentes revelam que o benznidazol pode causar alterações fetais graves, sendo assim, deve ser utilizado com cautela durante a gestação, visto que é o fármaco de referência para tratamento de infecções congênitas (FDA, 2017).

2.2 Desenvolvimento de novas drogas anti-Chagásicas

Segundo dados da OMS (2017), apesar de sua relevância, desde a sua descoberta, em 1909, a doença de Chagas não despertou muito interesse da indústria para estudos de desenvolvimento de novas drogas, sendo considerada uma doença negligenciada. Apenas na década de 70, surgiram dois compostos que apresentaram efetividade para esta doença, são eles: nifurtimox (Lampit[®], BAYER) e benznidazol (Rochagan[®], ROCHE).

Atualmente, no Brasil, ambos foram descontinuados por seus fabricantes. No entanto, no ano de 2003, o laboratório Roche cedeu os direitos de fabricação ao governo brasileiro, que firmou uma parceria com o Laboratório Farmacêutico Pernambucano (LAFEPE), que assumiu a produção dos comprimidos de benznidazol, sendo o único laboratório público no mundo que produz esse medicamento (LAFEPE, 2016).

Desde então, o LAFEPE firmou parcerias com várias entidades nacionais e internacionais comprometidas com o combate à doença de Chagas, como a Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDI), Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a Organização dos Médicos Sem Fronteiras (MSF).

Apesar do uso bem estabelecido do benznidazol, ainda há algumas barreiras no tratamento com este fármaco, como a baixa efetividade na fase crônica da doença e uma série de efeitos tóxicos e mutagênicos, como citados anteriormente e ainda somados com o desinteresse da indústria farmacêutica de estudar e desenvolver novos fármacos mais eficazes para esta doença.

Já está bem descrito na literatura que compostos derivados das aril-tiossemicarbazonas e aril-4-tiazolil-hidrazonas são promissores como agentes anti-Chagásicos (LIMA LEITE, 2006). No entanto, o delineamento da pesquisa para a eleição de um alvo molecular é uma etapa primordial, sendo assim, o Grupo de Pesquisa de Química Medicinal da UFPE, elegeu a enzima cruzaina do *T. cruzi* como alvo farmacológico, visto que, há evidências que indicam claramente que esta proteína é um alvo farmacológico para compostos anti-Chagásicos (URBINA e DOCAMPO, 2003).

Sendo assim, Oliveira-filho e colaboradores (2015), guiados por estudo de “docking” molecular pela cruzaina, foi realizada uma triagem virtual dos compostos mais ativos frente à enzima, sendo observados que derivados de aril-4-tiazolil-hidrazonas seriam bastante promissores, pois foram observadas importantes interações polares e hidrofóbicas destes compostos com a estrutura da cruzaina. Sendo assim, estas moléculas foram planejadas e em seguida sintetizadas.

Da série de moléculas sintetizadas, os compostos foram testados “*in vitro*” frente a forma tripomastigota do *T. cruzi*. Sendo os compostos LPqM9 e LPqM11, foram os mais ativos de toda a série com IC₅₀ de 3,97 e 1,79 µM respectivamente. Enquanto que a IC₅₀ do benznidazol foi de 10,61 µM. Os derivados de maior atividade foram então selecionados para a realização de ensaios de infecção por amastigotas. Estes compostos foram efetivos em reduzir 100% do número de células infectadas e o número de amastigotas intracelulares em cultura celular.

Em todos os modelos testados, estes protótipos revelaram se mais potentes e menos tóxicos que o benznidazol, no entanto, a segurança de uso *in vivo* destes protótipos ainda não foi estabelecida.

2.3 Avaliação toxicológica

A avaliação da segurança de uso é um processo fundamental para registro de qualquer produto que possa oferecer um risco direto ou indireto à saúde, sejam eles medicamentos, alimentos ou agrotóxicos. No Brasil, a ANVISA é o órgão responsável pela regulamentação deste processo.

Em 2013, a ANVISA deu um grande passo a fim de orientar a condução dos estudos não-clínicos quando publicou um documento denominado: “*Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos*”, onde o objetivo principal deste guia era favorecer uma padronização para que os testes fossem realizados de uma maneira harmonizada e cientificamente válida (ANVISA, 2013).

Sendo assim, este guia tomou como base documentos de agências de vigilância já reconhecidas pela comunidade acadêmica global, como a *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA) e ainda instituições de interesse na área de toxicologia como a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) e a *International Conference on Harmonisation* (ICH).

Diante disto, para registro de qualquer medicamento no Brasil, são necessários os dados de segurança não-clínica, que incluem estudos de toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, tolerância local, genotoxicidade e carcinogênese.

A toxicidade aguda ocorre quando é produzida por um produto farmacêutico quando administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas (FDA, 1996). Os estudos de toxicidade aguda têm por finalidade estimar a DL_{50} do produto e observar alterações fisiológicas ou ponderais nos animais (OECD, 2008). Este teste é muito importante para conhecer o poder lesivo dos compostos testados, sobretudo os mais tóxicos, visto que, uma pequena variação na dose administrada pode distinguir a segurança da letalidade.

Estudos de toxicidade de dose-repetida são realizados para pesquisar possíveis efeitos adversos de compostos quando administrados por um determinado período. Por meio deste teste é possível caracterizar o perfil toxicológico do composto, identificando órgãos-alvo, alterações na fisiologia do animal e parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos (OECD, 2008).

Os estudos de toxicidade reprodutiva buscam avaliar a segurança de uso de produtos durante a gestação, analisando o desenvolvimento pré e pós-natal e embrionário, incluindo análises teratogênicas ósseas e viscerais. Também estão incluídos nesses estudos a avaliação da performance reprodutiva feminina e masculina, onde serão analisadas alterações na fertilidade, libido e lesão à órgãos reprodutivos (OECD, 2015).

A avaliação de tolerância local ocorre em locais do corpo que, por ventura, poderão entrar em contato com o produto, em função da sua forma farmacêutica e aplicação clínica. Os testes efetuados nessa análise incluem: Testes de tolerância no local de administração, toxicidade sistêmica, tolerância para vias específicas e potencial de sensibilização (EMA, 2001).

Os estudos de genotoxicidade são testes *in vitro* e *in vivo* que buscam investigar mutações e/ou danos ao material genético (ICH, 2011). Os testes de carcinogenicidade buscam investigar compostos que por meio de um longo período de exposição, podem causar o desenvolvimento de tumores (OECD, 1981).

Diante do exposto, pode-se inferir a importância dos testes toxicológicos não-clínicos para o estudo de novas drogas, sobretudo, pois fazem parte da cadeia de desenvolvimento de fármacos. Sendo assim, considerando a relevância desta investigação, este estudo pretende estabelecer as bases científicas e avaliar a possível toxicidade não-clínica dos protótipos com atividade anti-Chagásica (LpQM9 e LpQM11) a fim de determinar a sua segurança do uso.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade não-clínica dos protótipos com atividade anti-Chagásica LpQM9 e LpQM11.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar a toxicidade aguda (DL_{50}) por via oral dos protótipos LPqM9 e LPqM11 em camundongos Swiss de ambos os sexos;
- Caracterizar os possíveis efeitos tóxicos da administração de doses repetidas (28 dias), por via oral, dos protótipos (LPqM9 e LPqM11) sobre os parâmetros ponderais de camundongos Swiss de ambos os sexos;
- Avaliar a toxicidade não-clínica dos protótipos (LPqM9 e LPqM11), mediante tratamento de doses repetidas (28 dias), por via oral, sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos de camundongos Swiss de ambos os sexos;
- Verificar os efeitos do tratamento de doses repetidas (28 dias), por via oral, dos protótipos (LPqM9 e LPqM11) sobre a morfologia macro e microscópica dos órgãos de camundongos Swiss de ambos os sexos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas, com massa corpórea 25 - 30g, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais receberam água e dieta (Presence, Paulínea, São Paulo, Brazil) *ad libitum* e foram mantidos em condições ambientais normais (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Todos os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética e Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, processo nº 23076.041290/2013-13 de acordo com o Instituto Nacional de guia de saúde para o cuidado e uso de animais de laboratório.

4.2 Avaliação toxicológica

Os testes de toxicidade seguiram os protocolos norteadores da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 407, 421 e 423).

4.2.1 Toxicidade aguda (DL_{50})

Foi usado o procedimento *Up and Down* (OECD 421). Três grupos de camundongos fêmeas ($n=5/\text{grupo}$) foram privadas de ração por 8h e em seguida receberam por via oral (1,0 g/kg) dos protótipos LpQM9 e LpQM11 ou veículo (sol. aquosa de Kolliphor® 0,5% - 0,1mL/10g). Após a administração, os animais foram observados individualmente durante os primeiros 30 minutos e a cada hora durante as primeiras 6h e diariamente por um período de 14 dias. Os camundongos foram observados diariamente quanto à mortalidade, consumo de ração e água, variação de massa corporal, sinais clínicos de toxicidade e alterações gerais de comportamento, tais como piloereção, salivação excessiva e sangramento (MALONE, 1977).

4.2.2 Toxicidade de dose-repetida (28 dias)

Catorze grupos de camundongos de ambos os sexos (n=5/grupo/sexo) foram distribuídos aleatoriamente e receberam, por via oral, durante 28 dias consecutivos (OECD 407) com os protótipos LpQM9 e LpQM11 (30, 100 e 300 mg/kg) e veículo (sol. aquosa de Kolliphor® 0,5% - 0,1mL/10g). Durante o período experimental, os consumos de água, ração e massa corporal dos animais foram registradas semanalmente. Os animais foram avaliados quanto à atividade comportamental, com a finalidade de detectar a presença de sinais clínicos de toxicidade como piloereção, diarreia e alterações na atividade locomotora. Ao final do período de administração, os animais foram submetidos a prévio jejum de 12h e em seguida, sob anestesia com xilazina + ketamina (6 + 60 mg/kg, i.p.) foi obtida à coleta de sangue por punção cardíaca. O sangue foi coletado em dois tipos de tubo: o primeiro com ác. etileno-diamino-tetraacético (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos e o segundo sem anticoagulante para determinação dos parâmetros bioquímicos (LIMA et al., 2009).

4.2.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Na avaliação hematológica os parâmetros: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW), plaquetas e leucócitos foram determinados imediatamente após a coleta com auxílio de analisador automático de células hematológicas (ABX®). A contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) foi realizada em extensões coradas com sistema reagente panótico rápido. Em cada ensaio, 100 células foram contadas (LIMA et al., 2009).

4.2.4 Avaliação dos Parâmetros bioquímicos

Para determinação bioquímica, o sangue coletado foi centrifugado a 1480 g durante 10 minutos para obtenção do soro (LIMA et al., 2009), em seguida, foram determinados os níveis de glicose, ureia, creatinina, ureia/creatinina, aminotransferases (AST e ALT), ácido úrico, bilirrubina total e direta, proteínas totais, albumina, triglicerídeos e colesterol total por meio do analisador automático Vitros 300 (Ortho Clinical Diagnostics, Nova Jersey, EUA) com sistemas comerciais da Johnson and Johnson (Nova Jersey, EUA).

4.2.5 Análise macroscópica dos órgãos

Imediatamente após a coleta de sangue, os animais foram submetidos à eutanásia por excesso de CO₂ e a necropsia foi realizada para avaliação da morfologia macroscópica externa dos órgãos: coração, pulmão, fígado, rins, glândulas adrenais, timo, testículos e próstata (machos) ou ovários e útero (fêmeas). Esses tecidos foram cuidadosamente removidos, dissecados e tiveram suas massas úmidas determinadas em balança analítica (LIMA et al., 2009). Os resultados foram expressos em termos de massa absoluta (g) e relativa (% de massa corporal).

4.2.6 Análise histopatológica

Amostras de fígado e rins, provenientes dos grupos experimentais, foram preservadas em formaldeído a 10% tamponado por 24 horas. Logo após, foram lavadas em solução tampão, desidratadas em álcool em série crescente de concentração e incluídas em glicol metacrilato historesina da Leica (Wetzlar, Alemanha). Os cortes de 4 µm foram obtidos em micrótomo Leica (Wetzlar, Alemanha) modelo RM 2245 equipado com navalha de vidro, distendidos em água destilada e colocados sobre lâminas, levados para secagem em estufa a 60°C por 1 minuto e submetidos às técnicas de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H.E). As lâminas em duplicatas/animal foram analisadas em microscópio de luz, da marca Leica modelo DM500 e fotografadas mediante o uso de câmera Leica modelo EC3 acoplada ao microscópio, bem como do software Leica Application Suite (LAS) EZ para análise histopatológica (ALMEIDA et al., 2014).

4.3 Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) ou mediana. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prism 5.0[®]. A homogeneidade das variâncias foi testada pelo método de Bartlett. Se a variância foi homogênea, os dados foram analisados por ANOVA, seguido, quando necessário, pelo teste de Tukey. Quando os dados não assumiram distribuição normal foram empregados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, quando aplicável. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Toxicidade aguda

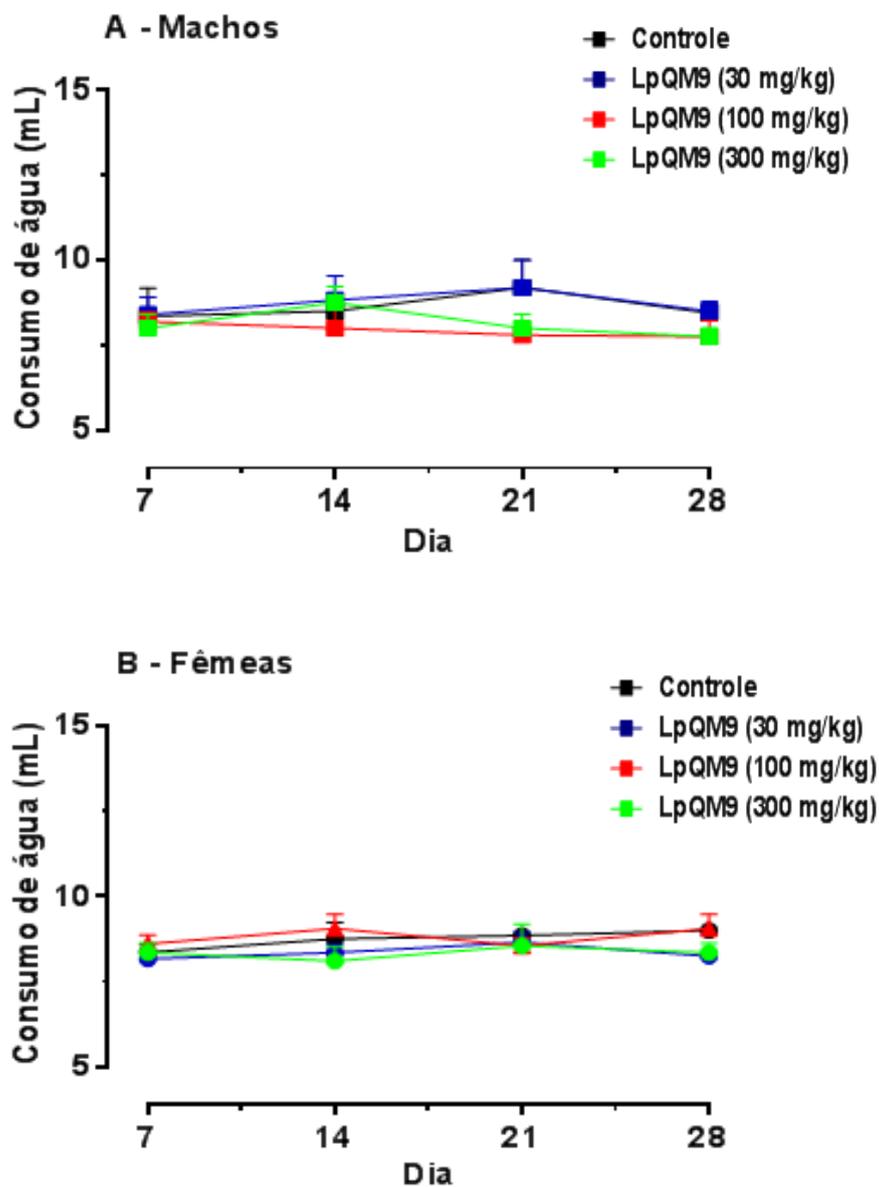
Observou-se que os protótipos LpQM9 e LpQM11 na dose de 1 g/kg não produziram sinais de toxicidade aguda visíveis ou morte nos animais tratados.

Nenhuma alteração significativa na ingestão de alimentos e de água ou no ganho de massa corporal foram registradas durante os 14 dias de observação.

5.2 Toxicidade de dose repetida

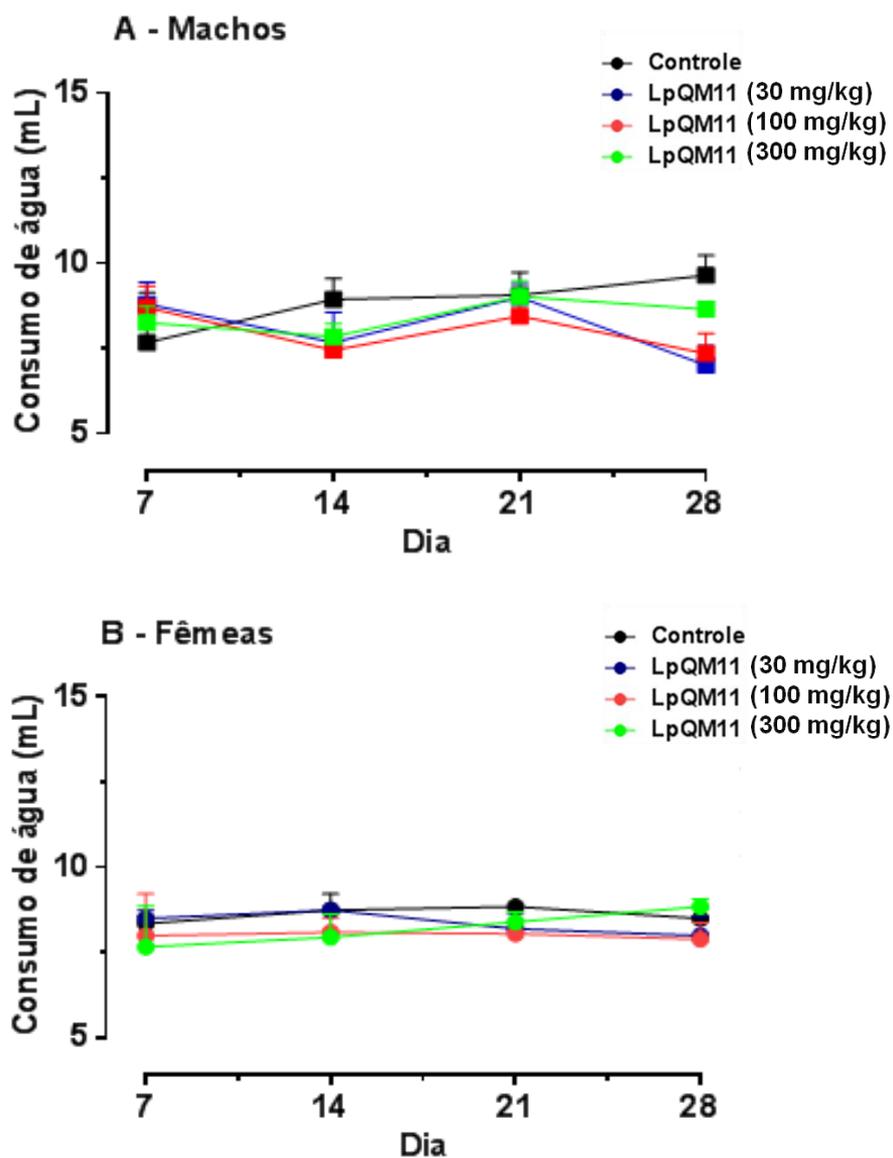
Nenhum sinal de toxicidade ou morte foi registrado durante os 28 dias de administração oral dos protótipos LpQM9 e LpQM11 (30, 100 e 300 mg/kg) nos animais em ambos os sexos. Como pode ser observado nas figuras 4 a 7, não houve alteração nos consumos de água e ração, exceto para o LpQM11 (30 e 100 mg/kg) em camundongos machos que induziram maior consumo de ração em todo o período de administração. O ganho de massa corporal dos camundongos não foi modificado pela administração de LpQM9 e LpQM11 (Figuras 8 e 9), exceto para o LpQM11 (30 e 100 mg/kg) que induziram maior ganho de massa corporal.

Figura 4. Efeito da administração por via oral de LpQM9 sobre o consumo de água em camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) durante 28 dias consecutivos.



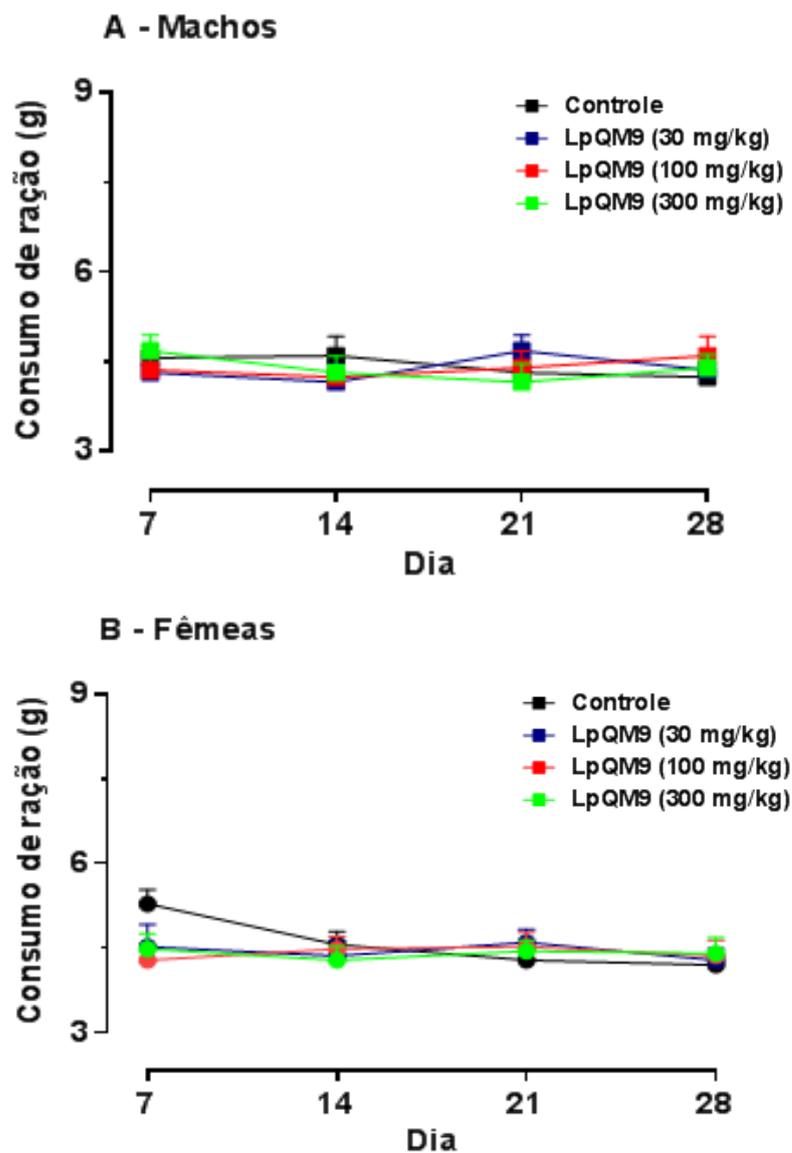
Os valores representam as médias \pm e.p.m. ($n = 5$ /grupo/sexo). O grupo controle recebeu Kolliphor[®] como veículo.

Figura 5. Efeito da administração por via oral de LpQM11 sobre o consumo de água em camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) durante 28 dias consecutivos.



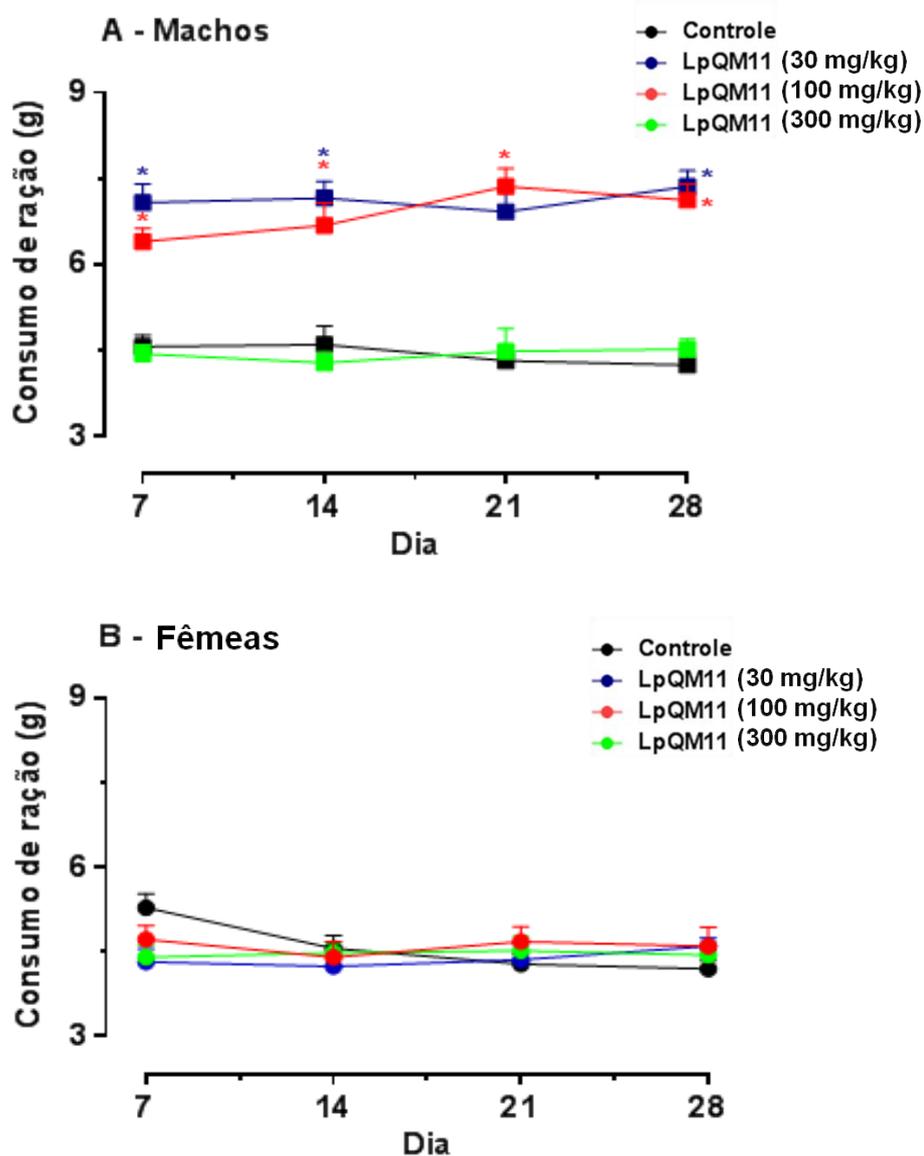
Os valores representam as médias \pm e.p.m. ($n = 5/\text{grupo}/\text{sexo}$). O grupo controle recebeu Kolliphor[®] como veículo.

Figura 6. Efeito da administração por via oral de LpQM9 sobre o consumo de ração em camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) durante 28 dias consecutivos.



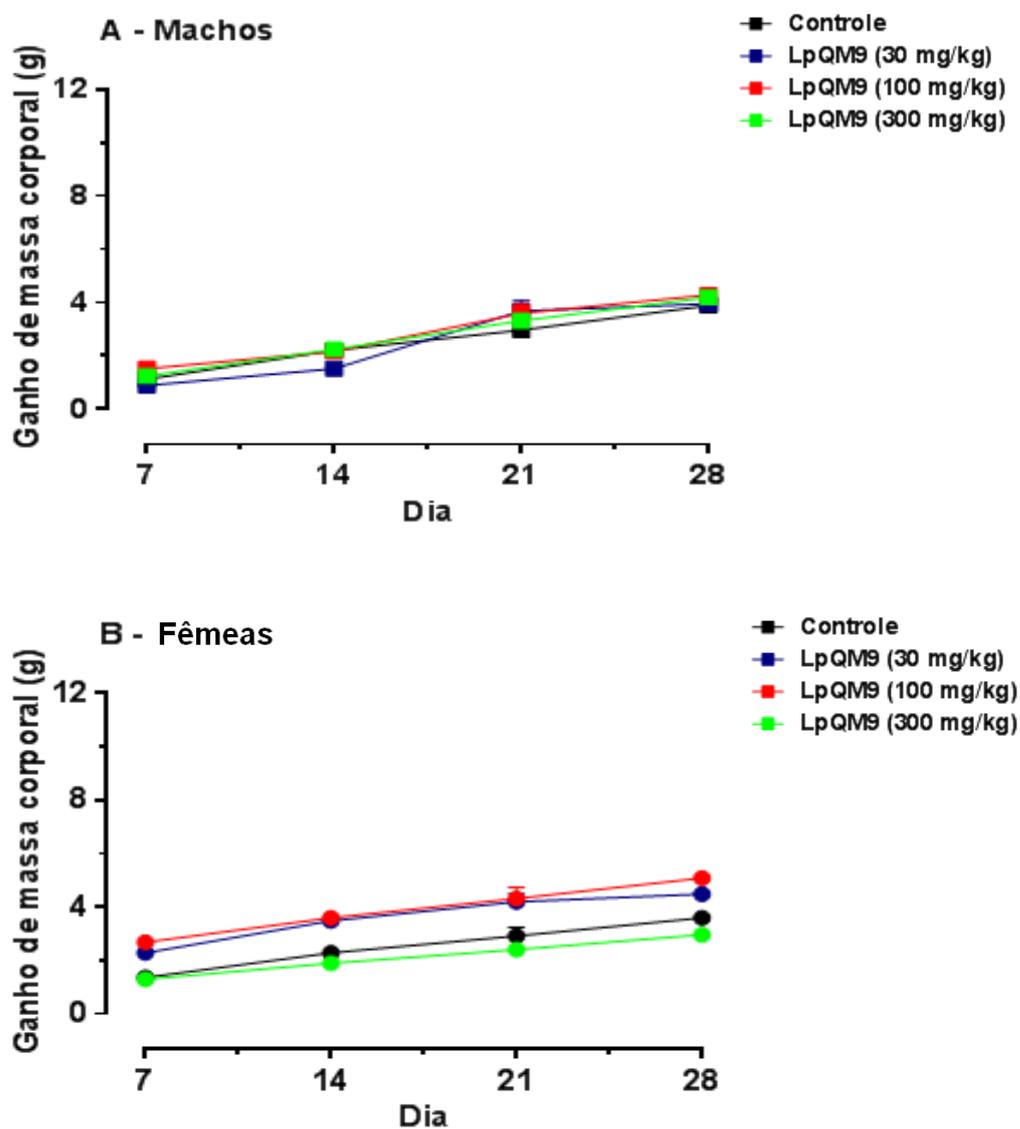
Os valores representam as médias \pm e.p.m. ($n = 5/\text{grupo}/\text{sexo}$). O grupo controle recebeu Kolliphor[®] como veículo.

Figura 7. Efeito da administração por via oral de LpQM11 sobre o consumo de ração em camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) durante 28 dias consecutivos.



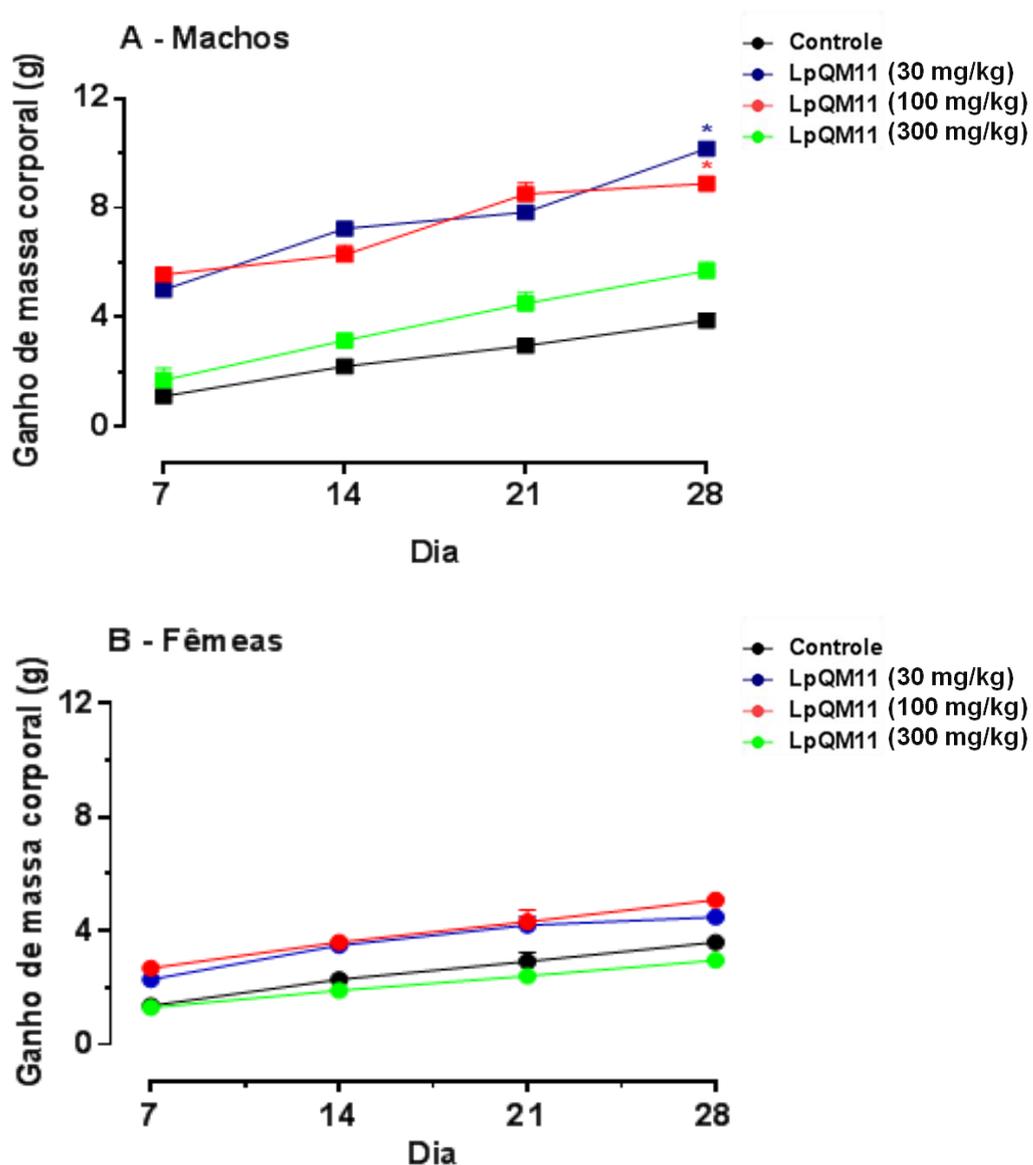
Os valores representam as médias \pm e.p.m. ($n = 5/\text{grupo}/\text{sexo}$). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, $*p < 0,05$). O grupo controle recebeu Kolliphor[®] como veículo.

Figura 8. Efeito da administração por via oral de LpQM9 sobre o ganho de massa corporal em camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) durante 28 dias consecutivos.



Os valores representam as médias \pm e.p.m. ($n = 5/\text{grupo}/\text{sexo}$). O grupo controle recebeu Kolliphor[®] como veículo.

Figura 9. Efeito da administração por via oral de LpQM11 sobre o ganho de massa corporal em camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) durante 28 dias consecutivos.



Os valores representam as médias \pm e.p.m. ($n = 5$ /grupo/sexo). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, $*p < 0,05$). O grupo controle recebeu Kolliphor[®] como veículo.

5.3 Parâmetros hematológicos

A influência do tratamento com LpQM9 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos machos e fêmeas são mostrados respectivamente nas tabelas 1 e 2. Pode-se notar que nos machos ocorreram apenas variações pontuais mostrando um discreto aumento nos parâmetros RDW (30 e 100 mg/Kg) e no número de plaquetas (100 mg/Kg) e nas fêmeas ocorreu um pequeno aumento no índice hematimétrico CHCM (100 e 300 mg/Kg) e na contagem diferencial de bastões (30 e 100 mg/Kg).

Já para o protótipo LpQM11 (Tabelas 3 e 4) ocorreu um aumento nos camundongos machos para plaquetas (100 e 300 mg/Kg) e diminuição no número de linfócitos (300 mg/Kg). Nas fêmeas registrou-se um aumento pontual nos valores de plaquetas (30 mg/Kg) e contagem diferencial dos bastões (100 mg/kg) e diminuição na percentagem de linfócitos (100 mg/kg).

Tabela 1. Efeito do LpQM9 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos tratados por via oral durante 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	LpQM9 30 mg/kg	LpQM9 100 mg/kg	LpQM9 300 mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	7,31 \pm 0,38	7,01 \pm 0,51	6,54 \pm 0,46	6,60 \pm 0,62
Hemoglobina (g/dL)	9,90 \pm 1,02	10,20 \pm 1,34	9,74 \pm 0,82	9,34 \pm 1,26
Hematócrito (%)	36,54 \pm 3,47	36,20 \pm 4,09	33,86 \pm 2,64	32,68 \pm 4,26
VCM (fL)	49,46 \pm 2,65	51,18 \pm 1,96	51,62 \pm 0,74	48,58 \pm 2,52
HCM (pg)	13,38 \pm 0,81	14,38 \pm 0,83	14,82 \pm 0,37	13,84 \pm 0,76
CHCM (g/dL)	27,00 \pm 0,42	28,00 \pm 0,65	28,70 \pm 0,33	28,52 \pm 0,37
RDW (%)	13,04 \pm 0,78	16,63 \pm 0,26*	15,78 \pm 0,34*	14,18 \pm 1,00
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	720,00 \pm 42,12	891,70 \pm 188,00	1030,00 \pm 60,88*	894,80 \pm 62,15
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,52 \pm 0,69	4,80 \pm 1,19	10,42 \pm 2,35	5,70 \pm 1,15
Bastões (%)	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Segmentados (%)	24,00 \pm 3,66	41,00 \pm 6,37	30,20 \pm 11,16	30,20 \pm 11,16
Eosinófilos (%)	1,20 \pm 0,37	0,60 \pm 0,40	1,40 \pm 0,24	1,60 \pm 0,24
Linfócitos (%)	71,00 \pm 3,96	57,80 \pm 4,91	67,00 \pm 4,25	73,40 \pm 6,07
Monócitos (%)	3,20 \pm 0,37	2,80 \pm 0,37	3,20 \pm 0,58	2,20 \pm 0,37

Os valores representam a média \pm e.p.m. de 5 camundongos. Determinações obtidas em aparelho ABX. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. RDW: amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada sobre extensões sanguíneas coradas com sistema reagente panóptico rápido, onde 100 células foram analisadas para cada experimento. O grupo controle recebeu Kolliphor® como veículo. Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$).

Tabela 2. Efeito do LpQM9 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	LpQM9	LpQM9	LpQM9
		30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	7,38 ± 0,3513	6,72 ± 0,77	6,82 ± 0,19	6,80 ± 0,18
Hemoglobina (g/dL)	10,92 ± 0,48	9,42 ± 1,61	10,26 ± 0,48	10,50 ± 0,29
Hematócrito (%)	39,26 ± 1,62	33,52 ± 5,45	35,04 ± 1,74	1,74 ± 0,92
VCM (fL)	53,22 ± 0,65	48,70 ± 2,93	51,26 ± 1,44	51,34 ± 0,40
HCM (pg)	14,80 ± 0,20	13,60 ± 0,94	14,98 ± 0,38	15,44 ± 0,24
CHCM (g/dL)	27,82 ± 0,15	27,90 ± 0,64	29,30 ± 0,13*	30,06 ± 0,28**
RDW (%)	14,16 ± 0,54	13,22 ± 0,88	14,74 ± 0,39	14,48 ± 0,36
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	530,80 ± 81,13	852,00 ± 4,77	766,40 ± 88,10	673,80 ± 35,69
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,54 ± 0,634	9,00 ± 0,32	6,58 ± 1,02	6,32 ± 0,75
Bastões (%)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Segmentados (%)	12,80 ± 1,02	37,00 ± 3,64***	31,20 ± 2,99***	19,00 ± 1,73
Eosinófilos (%)	1,40 ± 0,50	2,00 ± 0,40	1,80 ± 0,37	1,80 ± 0,20
Linfócitos (%)	87,40 ± 1,93	61,00 ± 5,87	68,60 ± 5,10	77,40 ± 3,23
Monócitos (%)	1,80 ± 0,58	2,50 ± 0,64	1,20 ± 0,20	1,60 ± 0,24

Os valores representam a média ± e.p.m. de 5 camundongos. Determinações obtidas em aparelho ABX. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. RDW: amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada sobre extensões sanguíneas coradas com sistema reagente panóptico rápido, onde 100 células foram analisadas para cada experimento. O grupo controle recebeu Kolliphor® como veículo. Grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Tabela 3. Efeito do LpQM11 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos tratados por via oral durante 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	LpQM11 30 mg/kg	LpQM11 100 mg/kg	LpQM11 300 mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	7,31 \pm 0,38	7,68 \pm 0,30	5,96 \pm 0,59	6,20 \pm 0,53
Hemoglobina (g/dL)	10,36 \pm 0,65	11,00 \pm 0,49	8,86 \pm 0,90	9,46 \pm 0,76
Hematócrito (%)	38,88 \pm 1,59	39,82 \pm 0,84	33,84 \pm 2,05	34,40 \pm 1,46
VCM (fL)	49,46 \pm 2,65	49,94 \pm 0,77	50,34 \pm 0,75	50,60 \pm 1,66
HCM (pg)	13,38 \pm 0,81	14,30 \pm 0,18	14,82 \pm 0,10	13,63 \pm 0,70
CHCM (g/dL)	27,00 \pm 0,42	28,12 \pm 0,31	27,62 \pm 0,27	26,93 \pm 0,57
RDW (%)	14,56 \pm 0,46	15,30 \pm 0,30	14,22 \pm 0,33	15,88 \pm 0,25
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	720,00 \pm 42,12	871,00 \pm 14,84	937,00 \pm 95,24*	1034,00 \pm 37,55*
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,52 \pm 0,69	8,94 \pm 0,88	8,12 \pm 1,20	23,57 \pm 4,74
Bastões (%)	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Segmentados (%)	26,20 \pm 2,47	18,72 \pm 1,76	21,04 \pm 3,11	40,90 \pm 2,77
Eosinófilos (%)	1,50 \pm 0,28	2,60 \pm 0,74	0,80 \pm 0,37	0,75 \pm 0,47
Linfócitos (%)	71,00 \pm 3,96	73,40 \pm 3,77	80,32 \pm 3,23	55,25 \pm 3,63*
Monócitos (%)	3,20 \pm 0,37	2,00 \pm 0,54	2,60 \pm 0,24	2,25 \pm 0,62

Os valores representam a média \pm e.p.m. de 5 camundongos. Determinações obtidas em aparelho ABX. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. RDW: amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada sobre extensões sanguíneas coradas com sistema reagente panóptico rápido, onde 100 células foram analisadas para cada experimento. O grupo controle recebeu Kolliphor[®] como veículo. Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$).

Tabela 4. Efeito do LpQM11 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	LpQM11 30 mg/kg	LpQM11 100 mg/kg	LpQM11 300 mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	7,38 ± 0,35	7,06 ± 0,25	6,96 ± 0,68	6,95 ± 0,66
Hemoglobina (g/dL)	10,92 ± 0,48	10,50 ± 0,29	10,72 ± 0,87	10,75 ± 0,59
Hematócrito (%)	39,26 ± 1,62	35,92 ± 1,39	39,00 ± 2,41	39,48 ± 0,89
VCM (fL)	53,22 ± 0,65	50,82 ± 0,49	48,90 ± 2,50	48,73 ± 3,82
HCM (pg)	14,80 ± 0,20	14,88 ± 0,15	14,36 ± 0,66	14,43 ± 0,50
CHCM (g/dL)	27,82 ± 0,15	29,30 ± 0,38	29,46 ± 0,36	30,00 ± 1,74
RDW (%)	14,16 ± 0,54	14,60 ± 1,38	13,60 ± 1,06	12,55 ± 1,13
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	530,80 ± 81,13	750,00 ± 37,86*	625,60 ± 17,00	691,00 ± 29,00
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,54 ± 0,63	6,62 ± 0,49	7,85 ± 0,41	8,47 ± 0,59
Bastões (%)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Segmentados (%)	12,80 ± 1,02	14,40 ± 1,36	28,20 ± 3,03**	19,20 ± 2,17
Eosinófilos (%)	1,60 ± 0,40	1,40 ± 0,40	1,200 ± 0,20	1,80 ± 0,20
Linfócitos (%)	87,40 ± 1,93	82,00 ± 2,72	68,60 ± 5,10**	77,40 ± 3,23
Monócitos (%)	1,40 ± 0,24	1,80 ± 0,20	1,20 ± 0,20	1,60 ± 0,24

Os valores representam a média ± e.p.m. de 5 camundongos. Determinações obtidas em aparelho ABX. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. RDW: amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada sobre extensões sanguíneas coradas com sistema reagente panóptico rápido, onde 100 células foram analisadas para cada experimento. O grupo controle recebeu Kolliphor® como veículo. Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

5.4 Parâmetros bioquímicos

O grupo de camundongos machos que receberam o composto LpQM9 apresentaram redução significativa no valor de glicose, creatinina, bilirrubina total e indireta para a dose de 30 mg/kg, triglicerídeos e colesterol total na dose de 100 mg/kg e GGT para as doses de 100 e 300 mg/kg (Tabela 5). Nas fêmeas ocorreu do aumento significativo da glicose e diminuição da bilirrubina total em todas as doses de LpQM9, além disso, aumento o colesterol total na dose de 100 mg/kg (Tabela 6).

O composto LpQM11 induziu nos camundongos machos um aumento estatístico no valor de glicose e colesterol total na dose de 100 mg/kg e GGT em todos os grupos experimentais. Ainda ocorreu diminuição dos níveis de bilirrubina direta nas doses de 30 e 100 mg/kg (Tabela 7). Nas fêmeas registrou-se também aumento nos níveis de glicose em todas as doses e colesterol total na dose de 100 mg/kg. Pode-se observar também uma diminuição da enzima aspartato amino-transferase (AST) nas doses de 30 e 300 mg/kg (Tabela 8).

Tabela 5. Efeito do LpQM9 sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss machos tratados por via oral durante 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	LpQM9 30 mg/kg	LpQM9 100 mg/kg	LpQM9 300 mg/kg
Glicose (mg/dL)	97,67 ± 7,57	171,30 ± 22,04**	83,50 ± 8,51	132,00 ± 11,72
Ureia (mg/dL)	51,75 ± 3,86	52,00 ± 4,54	34,75 ± 0,75	55,05 ± 4,48
Creatinina (mg/dL)	0,18 ± 0,02	0,32 ± 0,04*	0,26 ± 0,02	0,20 ± 0,04
AST (U/L)	248,00 ± 25,62	168,30 ± 19,06	342,30 ± 13,12	381,30 ± 9,35
ALT (U/L)	50,25 ± 4,58	46,00 ± 1,51	48,25 ± 4,38	44,00 ± 2,00
GGT (U/L)	2,50 ± 0,28	2,25 ± 0,25	4,80 ± 0,37**	4,50 ± 0,64*
LDH (U/L)	2931,00 ± 174,60	2601,00 ± 246,20	2910,00 ± 140,30	2537,00 ± 68,21
Ácido úrico	2,00 ± 0,36	1,50 ± 0,28	3,20 ± 0,37	2,60 ± 0,24
Bilirrubina total	0,17 ± 0,00	0,11 ± 0,01*	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Bilirrubina direta	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00
Bilirrubina indireta	0,11 ± 0,00	0,05 ± 0,00*	0,09 ± 0,00	0,12 ± 0,00
Proteínas totais	4,56 ± 0,26	4,42 ± 0,23	4,70 ± 0,28	4,10 ± 0,19
Albumina	3,23 ± 0,14	3,02 ± 0,04	3,18 ± 0,12	3,50 ± 0,24
Triglicerídeos	81,65 ± 6,14	74,00 ± 5,56	137,3 ± 21,68*	76,33 ± 2,84
Colesterol total	66,60 ± 2,08	78,75 ± 3,06	95,75 ± 5,73***	68,33 ± 2,84
Fosfatase alcalina	260,70 ± 29,36	294,7 ± 25,69	136,50 ± 13,41	288,30 ± 38,08

Os valores representam a média ± e.p.m de 5 animais. As dosagens foram obtidas em aparelho analisador automático Vitros 300 (Ortho Clinical Diagnostics) com sistemas comerciais da Johnson and Johnson. AST: Aspartatato aminotransferase, ALT: Alanina aminotransferase, GGT: gama glutamil transferase e LDH: Lactato desidrogenase. O grupo controle recebeu Kolliphor® como veículo. Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001).

Tabela 6. Efeito do LpQM9 sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	LpQM9 30 mg/kg	LpQM9 100 mg/kg	LpQM9 300 mg/kg
Glicose (mg/dL)	97,00 ± 3,87	172,30 ± 18,19*	188,80 ± 17,75**	172,70 ± 10,27*
Ureia (mg/dL)	40,25 ± 3,79	49,00 ± 5,49	46,50 ± 3,59	42,00 ± 5,58
Creatinina (mg/dL)	0,25 ± 0,05	0,22 ± 0,03	0,28 ± 0,02	0,36 ± 0,16
AST (U/L)	235,00 ± 11,53	262,80 ± 30,50	275,70 ± 27,94	206,30 ± 26,40
ALT (U/L)	48,60 ± 4,71	43,40 ± 5,68	50,75 ± 3,22	43,00 ± 2,64
GGT (U/L)	2,25 ± 0,62	2,33 ± 0,66	2,33 ± 0,33	2,25 ± 0,25
LDH (U/L)	2935,00 ± 73,27	2750,00 ± 202,70	2693,00 ± 129,60	2891,00 ± 143,00
Ácido úrico	1,40 ± 0,24	1,75 ± 0,25	1,75 ± 0,25	1,50 ± 0,28
Bilirrubina total	0,31 ± 0,02	0,19 ± 0,01**	0,18 ± 0,01**	0,17 ± 0,01**
Bilirrubina direta	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,01
Bilirrubina indireta	0,25 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,12 ± 0,01
Proteínas totais	5,42 ± 0,47	5,42 ± 0,36	5,33 ± 0,37	5,20 ± 0,27
Albumina	3,47 ± 0,09	3,05 ± 0,12	3,02 ± 0,06	3,32 ± 0,13
Triglicerídeos	88,67 ± 2,90	81,33 ± 4,80	81,33 ± 8,19	69,50 ± 7,80
Colesterol total	64,75 ± 4,76	69,00 ± 6,33	86,00 ± 1,87*	75,00 ± 3,10
Fosfatase alcalina	260,30 ± 3,18	296,00 ± 30,81	248,70 ± 24,17	315,30 ± 30,66

Os valores representam a média ± e.p.m de 5 animais. As dosagens foram obtidas em aparelho analisador automático Vitros 300 (Ortho Clinical Diagnostics) com sistemas comerciais da Johnson and Johnson. AST: Aspartatato aminotransferase, ALT: Alanina aminotransferase, GGT: gama glutamil transferase e LDH: Lactato desidrogenase. O grupo controle recebeu Kolliphor® como veículo. Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 e **p<0,01).

Tabela 7. Efeito do LpQM11 sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss machos tratados por via oral durante 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	LpQM11 30 mg/kg	LpQM11 100 mg/kg	LpQM11 300 mg/kg
Glicose (mg/dL)	97,67 ± 7,57	93,50 ± 8,21	165,00 ± 12,26***	128,30 ± 9,38
Ureia (mg/dL)	51,75 ± 3,86	47,60 ± 4,55	47,20 ± 3,02	54,65 ± 5,31
Creatinina (mg/dL)	0,18 ± 0,02	0,32 ± 0,04	0,26 ± 0,02	0,20 ± 0,04
AST (U/L)	248,00 ± 25,62	252,30 ± 24,78	335,30 ± 18,65	227,70 ± 16,19
ALT (U/L)	50,25 ± 4,58	38,20 ± 3,83	54,65 ± 2,56	42,25 ± 2,21
GGT (U/L)	2,50 ± 0,28	6,25 ± 0,47***	4,40 ± 0,24**	4,25 ± 0,25*
LDH (U/L)	2931,00 ± 174,60	2408,00 ± 218,30	2910,00 ± 140,30	2437,00 ± 68,69
Ácido úrico	2,00 ± 0,36	2,00 ± 0,31	1,50 ± 0,28	2,00 ± 0,25
Bilirrubina total	0,17 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Bilirrubina direta	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,05 ± 0,00
Bilirrubina indireta	0,11 ± 0,00	0,03 ± 0,01**	0,04 ± 0,01*	0,11 ± 0,01
Proteínas totais	4,56 ± 0,26	4,70 ± 0,12	4,37 ± 0,14	4,20 ± 0,20
Albumina	3,23 ± 0,14	3,15 ± 0,08	3,20 ± 0,10	3,30 ± 0,23
Triglicerídeos	81,65 ± 6,14	71,67 ± 6,74	99,67 ± 5,81	85,00 ± 5,68
Colesterol total	66,60 ± 2,08	83,50 ± 3,75	105,80 ± 11,05***	63,00 ± 5,27
Fosfatase alcalina	260,70 ± 29,36	211,30 ± 5,73	264,80 ± 22,61	242,30 ± 21,17

Os valores representam a média ± e.p.m de 5 animais. As dosagens foram obtidas em aparelho analisador automático Vitros 300 (Ortho Clinical Diagnostics) com sistemas comerciais da Johnson and Johnson. AST: Aspartato aminotransferase, ALT: Alanina aminotransferase, GGT: gama glutamil transferase e LDH: Lactato desidrogenase. O grupo controle recebeu Kolliphor® como veículo. Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001).

Tabela 8. Efeito do LpQM11 sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	LpQM11 30 mg/kg	LpQM11 100 mg/kg	LpQM11 300 mg/kg
Glicose (mg/dL)	97,00 ± 3,87	160,00 ± 13,32**	197,30 ± 16,70***	177,20 ± 6,80***
Ureia (mg/dL)	40,25 ± 3,79	49,65 ± 1,88	44,00 ± 1,29	43,00 ± 2,94
Creatinina (mg/dL)	0,25 ± 0,05	0,12 ± 0,02	0,16 ± 0,04	0,15 ± 0,02
AST (U/L)	235,00 ± 11,53	157,30 ± 13,88**	206,30 ± 10,14	155,80 ± 9,36**
ALT (U/L)	48,60 ± 4,71	38,20 ± 3,83	54,75 ± 2,56	42,25 ± 2,21
GGT (U/L)	2,25 ± 0,62	3,75 ± 0,47	2,75 ± 0,47	2,50 ± 0,28
LDH (U/L)	2935,00 ± 73,27	2508,00 ± 126,80	2549,00 ± 221,40	3328,00 ± 300,10
Ácido úrico	1,40 ± 0,24	1,60 ± 0,24	1,50 ± 0,28	1,75 ± 0,25
Bilirrubina total	0,31 ± 0,02	0,27 ± 0,05	0,28 ± 0,04	0,30 ± 0,02
Bilirrubina direta	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Bilirrubina indireta	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,04	0,23 ± 0,03	0,25 ± 0,01
Proteínas totais	5,42 ± 0,47	5,22 ± 0,28	5,37 ± 0,26	5,20 ± 0,24
Albumina	3,47 ± 0,09	3,00 ± 0,16	3,30 ± 0,23	0,37 ± 0,17
Triglicerídeos	88,67 ± 2,90	78,67 ± 5,81	82,67 ± 6,96	79,50 ± 5,56
Colesterol total	64,75 ± 4,76	69,00 ± 6,33	86,00 ± 1,87*	75,00 ± 3,10
Fosfatase alcalina	260,30 ± 3,18	256,00 ± 11,53	241,70 ± 27,02	259,70 ± 15,19

Os valores representam a média ± e.p.m de 5 animais. As dosagens foram obtidas em aparelho analisador automático Vitros 300 (Ortho Clinical Diagnostics) com sistemas comerciais da Johnson and Johnson. AST: Aspartato aminotransferase, ALT: Alanina aminotransferase, GGT: gama glutamil transferase e LDH: Lactato desidrogenase. O grupo controle recebeu Kolliphor® como veículo. Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001).

5.5 Morfologia macroscópica

A análise macroscópica mostrou que o LpQM9 não modificou as massas absolutas e relativas dos diversos tecidos de camundongos machos estudados, contudo nas fêmeas houve aumento relativo do percentual da massa do pulmão (100 e 300 mg/kg) e glândulas adrenais em todas as doses administradas (tabelas 9 e 10). O efeito do LpQM11 nos animais machos na dose de 300 mg/kg aumentou massa percentual do coração, pulmão, fígado e rins e ainda a massa absoluta do fígado, enquanto a dose de 30 mg/kg aumentou a massa das glândulas adrenais, a dose de 100 mg/kg não produziu nenhuma alteração. Verificou-se também uma diminuição da massa absoluta e relativa das glândulas adrenais das fêmeas em todas as doses administradas (tabelas 11 e 12).

Tabela 9. Efeito do LpQM9 sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de camundongos Swiss machos tratados por via oral durante 28 dias consecutivos.

Tecidos	Controle	LpQM9 30 mg/kg	LpQM9 100 mg/kg	LpQM9 300 mg/kg
Coração (g)	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,01
Coração (%)	0,39 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,42 ± 0,03
Pulmão (g)	0,18 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,02
Pulmão (%)	0,47 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,50 ± 0,05	0,56 ± 0,08
Fígado (g)	1,40 ± 0,11	1,49 ± 0,08	1,41 ± 0,14	1,63 ± 0,08
Fígado (%)	3,70 ± 0,20	3,97 ± 0,08	3,34 ± 0,25	4,15 ± 0,26
Rins (g)	0,45 ± 0,03	0,38 ± 0,02	0,48 ± 0,02	0,47 ± 0,02
Rins (%)	1,19 ± 0,02	1,03 ± 0,01	1,28 ± 0,02	1,19 ± 0,03
Adrenais (g)	0,014 ± 0,002	0,012 ± 0,003	0,013 ± 0,002	0,012 ± 0,003
Adrenais (%)	0,037 ± 0,001	0,030 ± 0,003	0,034 ± 0,002	0,030 ± 0,002
Timo (g)	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Timo (%)	0,18 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,02
Testículos (g)	0,22 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Testículos (%)	0,58 ± 0,04	0,49 ± 0,05	0,58 ± 0,08	0,56 ± 0,07
Epidídimo (g)	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Epidídimo (%)	0,15 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,04	0,12 ± 0,05

Os valores representam a média ± e.p.m de 5 animais por grupo.
O grupo controle recebeu Kolliphor® como veículo.

Tabela 10. Efeito do LpQM9 sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos.

Tecidos	Controle	LpQM9 30 mg/kg	LpQM9 100 mg/kg	LpQM9 300 mg/kg
Coração (g)	0,15 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Coração (%)	0,39 ± 0,03	0,36 ± 0,07	0,37 ± 0,04	0,46 ± 0,02
Pulmão (g)	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,23 ± 0,01
Pulmão (%)	0,42 ± 0,08	0,42 ± 0,09	0,62 ± 0,06*	0,70 ± 0,07*
Fígado (g)	1,55 ± 0,05	1,47 ± 0,10	1,66 ± 0,11	1,71 ± 0,08
Fígado (%)	4,12 ± 0,03	4,44 ± 0,09	5,22 ± 0,09	5,25 ± 0,06
Rins (g)	0,38 ± 0,02	0,36 ± 0,04	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Rins (%)	1,01 ± 0,03	1,08 ± 0,04	1,03 ± 0,03	1,01 ± 0,03
Adrenais (g)	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Adrenais (%)	0,079 ± 0,005	0,026 ± 0,003***	0,032 ± 0,002***	0,034 ± 0,004***
Timo (g)	0,072 ± 0,008	0,071 ± 0,007	0,066 ± 0,006	0,067 ± 0,003
Timo (%)	0,19 ± 0,05	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,04	0,20 ± 0,03
Ovários (g)	0,044 ± 0,008	0,046 ± 0,004	0,034 ± 0,002	0,037 ± 0,004
Ovários (%)	0,11 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,05
Útero (g)	0,122 ± 0,018	0,069 ± 0,005	0,127 ± 0,017	0,128 ± 0,010
Útero (%)	0,32 ± 0,09	0,20 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,04

Os valores representam a média ± e.p.m de 5 animais por grupo.

Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$ e

*** $p < 0,001$).

Tabela 11. Efeito do LpQM11 sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de camundongos Swiss machos tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos.

Tecidos	Controle	LpQM11 30 mg/kg	LpQM11 100 mg/kg	LpQM11 300 mg/kg
Coração (g)	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,30 ± 0,01
Coração (%)	0,39 ± 0,05	0,45 ± 0,12	0,58 ± 0,11	0,97 ± 0,11*
Pulmão (g)	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,02
Pulmão (%)	0,48 ± 0,04	0,48 ± 0,11	0,68 ± 0,05	0,79 ± 0,09*
Fígado (g)	1,40 ± 0,14	1,86 ± 0,18	1,54 ± 0,15	2,42 ± 0,24**
Fígado (%)	3,72 ± 0,38	5,01 ± 0,37	4,63 ± 0,43	8,37 ± 0,68**
Rins (g)	0,45 ± 0,03	0,38 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,54 ± 0,05
Rins (%)	1,19 ± 0,15	1,02 ± 0,07	1,23 ± 0,06	1,87 ± 0,17*
Adrenais (g)	0,014 ± 0,002	0,040 ± 0,005**	0,014 ± 0,004	0,026 ± 0,007
Adrenais (%)	0,037 ± 0,11	0,107 ± 0,00	0,045 ± 0,006	0,090 ± 0,009
Timo (g)	0,081 ± 0,009	0,063 ± 0,007	0,055 ± 0,004	0,063 ± 0,007
Timo (%)	0,21 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,21 ± 0,04
Testículos (g)	0,281 ± 0,056	0,209 ± 0,013	0,211 ± 0,005	0,249 ± 0,013
Testículos (%)	0,74 ± 0,06	0,56 ± 0,09	0,68 ± 0,07	0,86 ± 0,08
Epidídimo (g)	0,075 ± 0,010	0,051 ± 0,005	0,064 ± 0,004	0,072 ± 0,004
Epidídimo (%)	0,19 ± 0,07	0,13 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,25 ± 0,07

Os valores representam a média ± e.p.m de 5 animais por grupo.

Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Tabela 12. Efeito do LpQM11 sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de camundongos Swiss fêmeas tratadas por via oral durante 28 dias consecutivos.

Tecidos	Controle	LpQM11 30 mg/kg	LpQM11 100 mg/kg	LpQM11 300 mg/kg
Coração (g)	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,03
Coração (%)	0,39 ± 0,04	0,38 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,34 ± 0,01
Pulmão (g)	0,16 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,01
Pulmão (%)	0,42 ± 0,03	0,58 ± 0,04	0,48 ± 0,01	0,44 ± 0,01
Fígado (g)	1,55 ± 0,05	1,47 ± 0,10	1,66 ± 0,11	1,71 ± 0,08
Fígado (%)	4,10 ± 0,49	4,08 ± 0,34	5,00 ± 0,42	3,96 ± 0,30
Rins (g)	0,38 ± 0,02	0,36 ± 0,04	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Rins (%)	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,09	0,99 ± 0,01	0,76 ± 0,01
Adrenais (g)	0,024 ± 0,005	0,005 ± 0,004***	0,004 ± 0,001***	0,007 ± 0,002*
Adrenais (%)	0,065 ± 0,004	0,016 ± 0,001*	0,012 ± 0,007*	0,016 ± 0,003*
Timo (g)	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Timo (%)	0,45 ± 0,03	0,41 ± 0,01	0,42 ± 0,04	0,32 ± 0,03
Ovários (g)	0,042 ± 0,009	0,048 ± 0,004	0,038 ± 0,009	0,032 ± 0,004
Ovários (%)	0,114 ± 0,011	0,130 ± 0,022	0,114 ± 0,012	0,072 ± 0,004
Útero (g)	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,02
Útero (%)	0,31 ± 0,03	0,33 ± 0,02	0,51 ± 0,05	0,32 ± 0,01

Os valores representam a média ± e.p.m de 5 animais por grupo.

Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$ e

*** $p < 0,001$).

5.6 Análise histopatológica

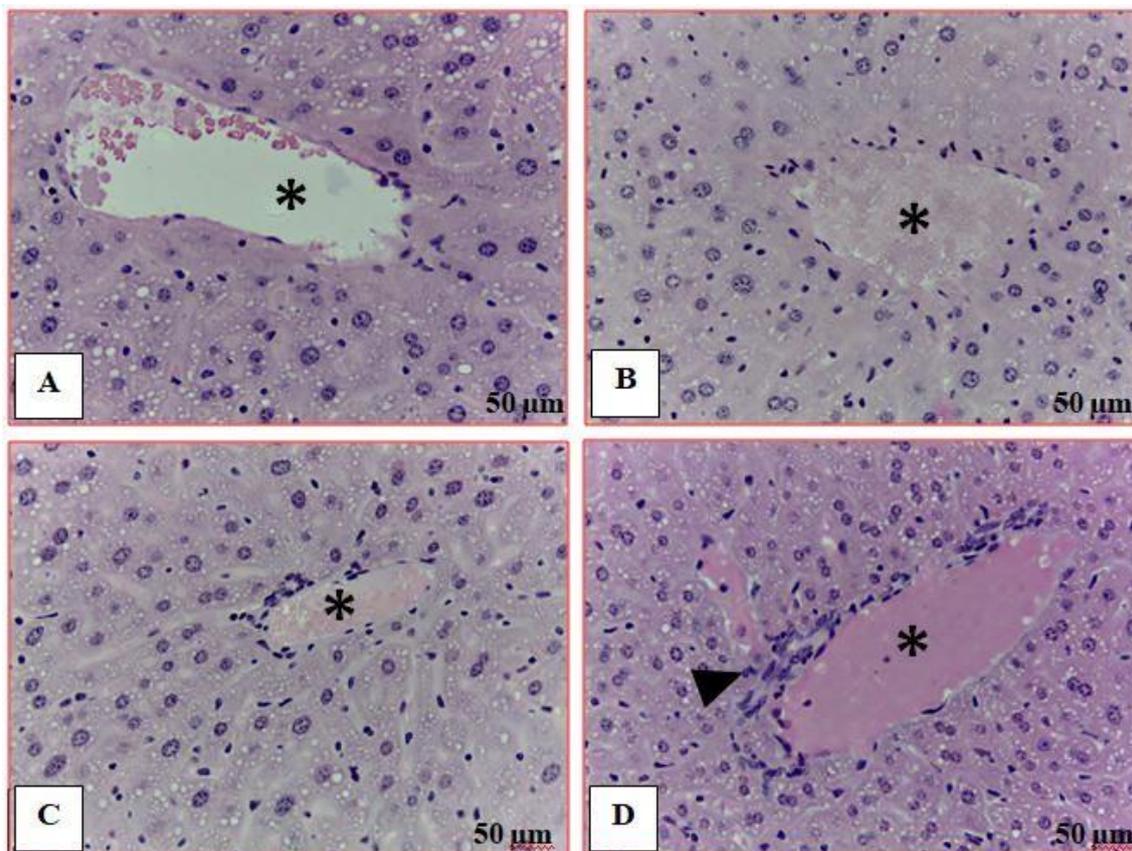
A análise histopatológica dos órgãos dos camundongos machos indicou uma congestão da veia centro lobular no fígado dos animais de todos os grupos experimentais que receberam o protótipo LpQM9 e ainda um discreto infiltrado inflamatório no grupo da maior dose (Figura 10). Na investigação histopatológica renal (Figura 11), foram observadas uma degeneração do epitélio colunar e congestão vascular em todos os grupos, como também redução do espaço capsular (grupos 30 e 100 mg/Kg) e ainda hiperplasticidade, indicativo de glomerulonefrite (grupos 300 mg/kg).

Em relação às fêmeas, a análise histopatológica do fígado (Figura 12) apresentou uma congestão da veia centro lobular em todas as doses que receberam o LpQM9, além de desorganização dos cordões e hepatócitos (grupo 30 mg/Kg) e uma reação inflamatória local (grupos 100 e 300 mg/Kg). Nos rins, foi possível observar uma redução no espaço capsular e congestão capilar em todos os grupos, degeneração do epitélio simples (grupos 100 e 300 mg/Kg) e hiperplasticidade glomerular (300 mg/kg) (Figura 13).

Os animais machos que receberam o LpQM11 apresentaram congestão na veia centro lobular no fígado em todos grupos e ainda uma reação inflamatória local nas maiores doses (Figura 14). Nos rins, foi possível o observar uma redução do espaço capsular (grupo 30 mg/kg), desorganização do epitélio colunar simples (grupo 100 mg/kg) e ainda um infiltrado inflamatório com aumento de glomérulo, indicativo de glomerulonefrite (grupo 300 mg/kg), conforme pode ser observado na Figura 15.

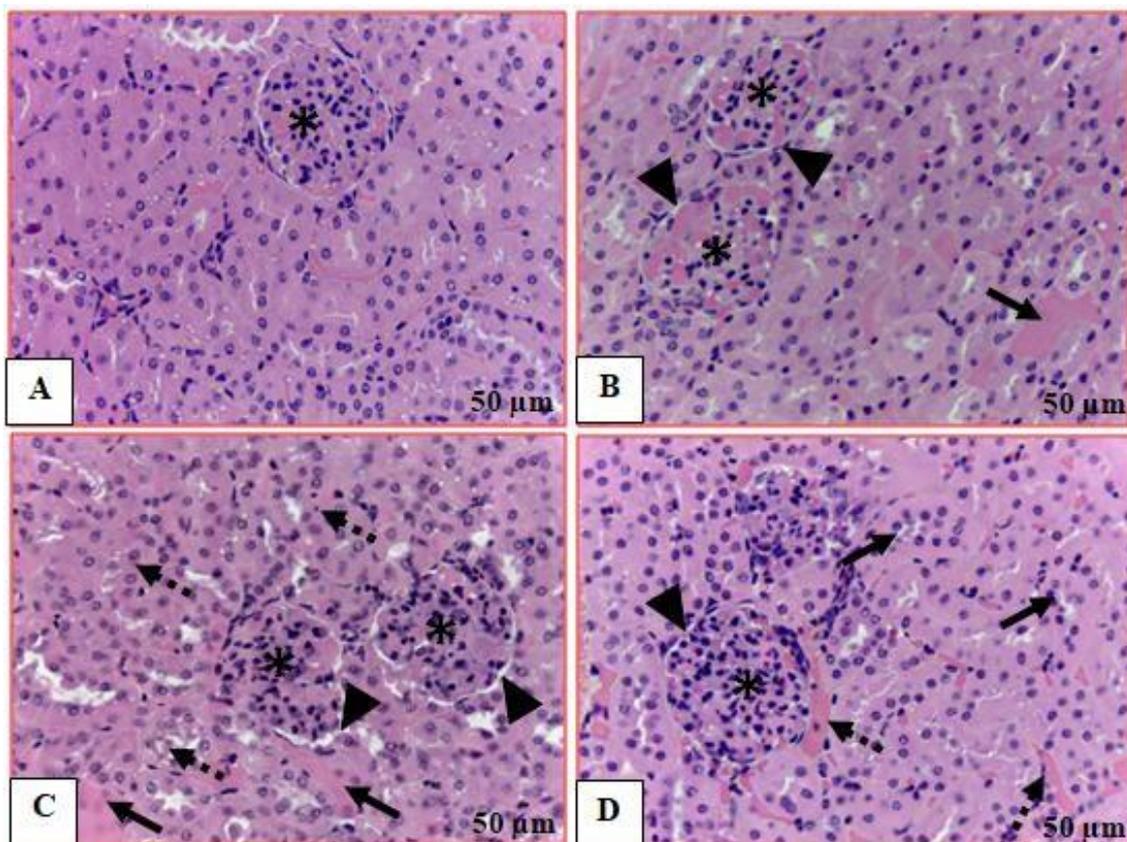
A análise do fígado das fêmeas que receberam o LpQM11 mostrou uma congestão da veia centro lobular e reações inflamatórias locais em todas as doses administradas, além disso, a maior dose provocou uma aparente esteatose microvesicular (Figura 16). A análise dos rins permitiu verificar uma desorganização do epitélio colunar simples apenas nos grupos que receberam a menor dose do protótipo LpQM11 e uma redução do espaço capsular nos grupos que receberam a menor dose e a dose intermediária. Os grupos em que foram administradas as maiores doses apresentaram degeneração leve do epitélio colunar e apenas na maior dose foi possível observar capilares congestionados e hiperplasticidade (Figura 17).

Figura 10. Fotomicrografias do fígado de camundongos machos dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM9 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).



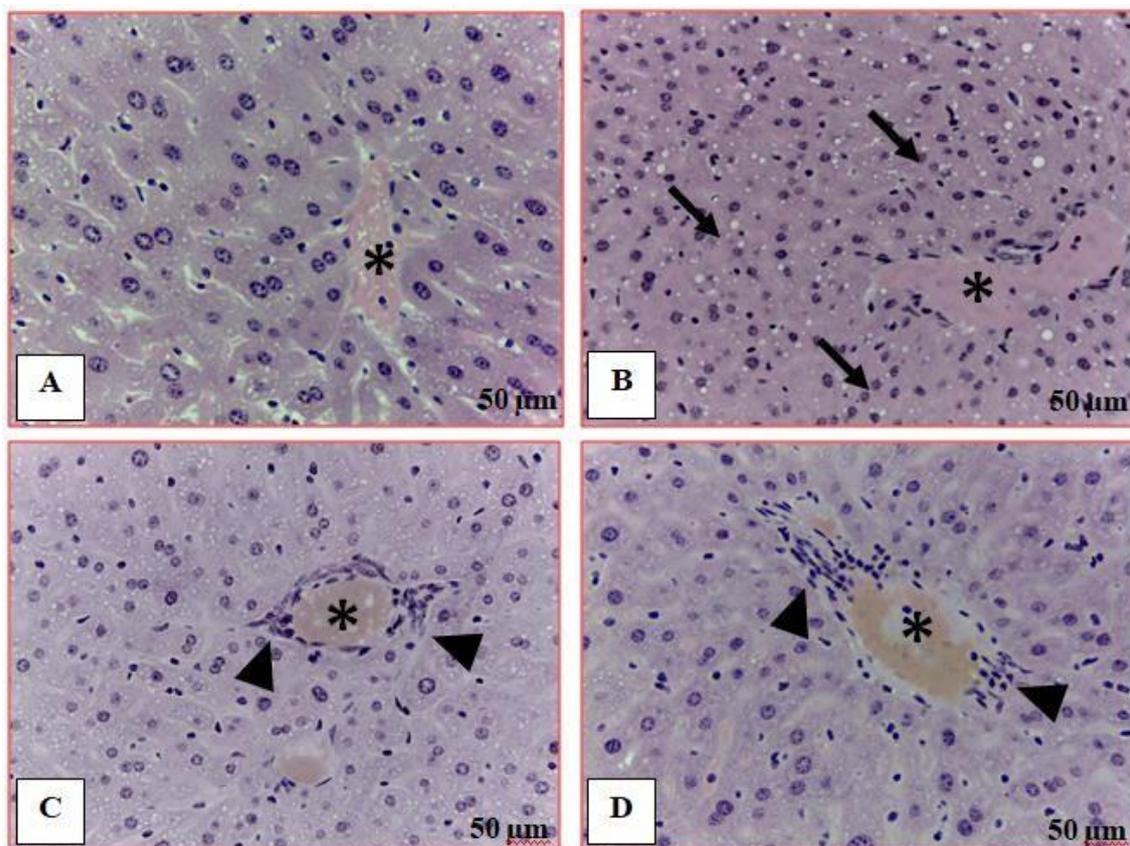
(A) Parênquima hepático e veia centro lobular bem preservados (asterisco); (B) Congestão da veia centro lobular (asterisco); (C) Congestão da veia centro lobular (asterisco); (D) Infiltrado inflamatório discreto (cabeça de seta) e congestão da veia centro lobular (asterisco).

Figura 11. Fotomicrografias dos rins de camundongos machos dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM9 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).



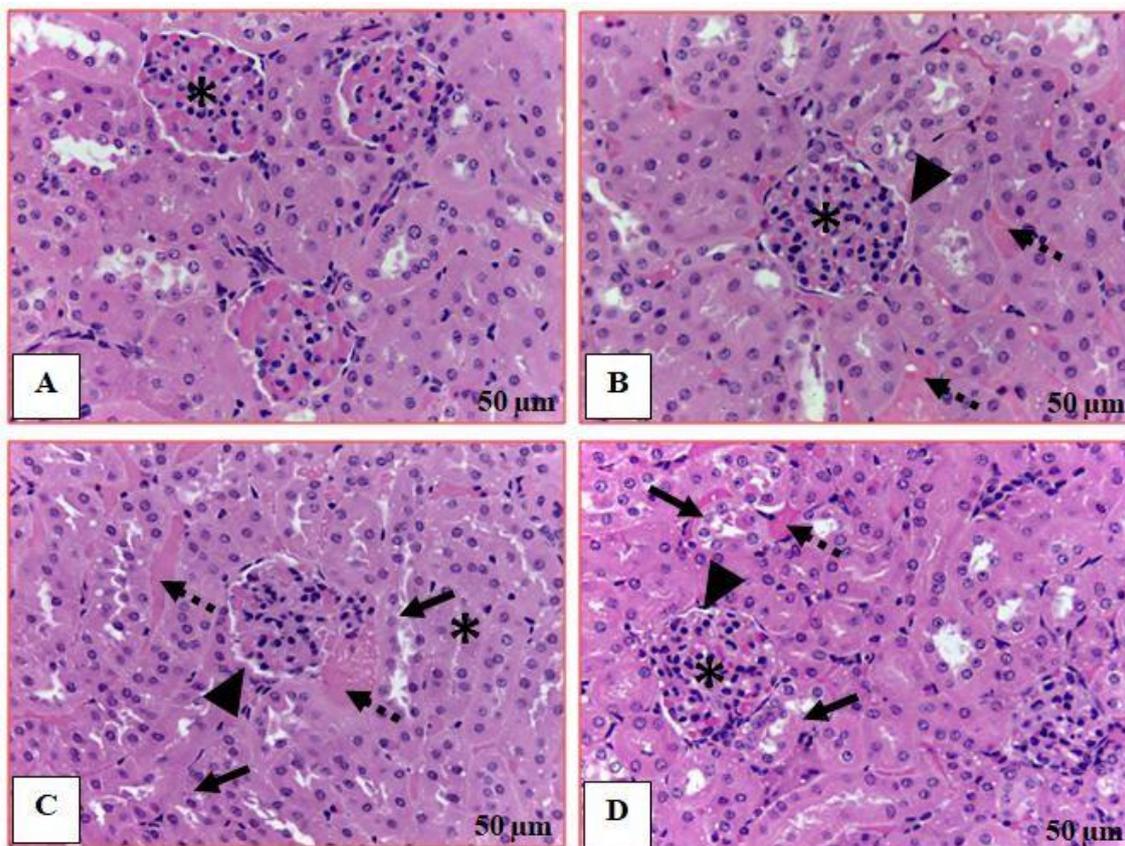
(A) Epitélio simples cúbico dos túbulos contorcidos e glomérulo bem preservados (asterisco). (B) Degeneração do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeças de seta), congestão vascular (seta), além de redução acentuada do espaço capsular (asterisco). (C) Degeneração leve do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (setas tracejadas), redução do espaço capsular acentuada (cabeça de setas) e congestão vascular (setas). (D) Degeneração leve do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeça de seta), capilares congestionados (setas tracejadas) e hiper celularidade leve nos glomérulos indicando glomerulonefrite (asterisco).

Figura 12. Fotomicrografias do fígado de camundongos fêmeas dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM9 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).



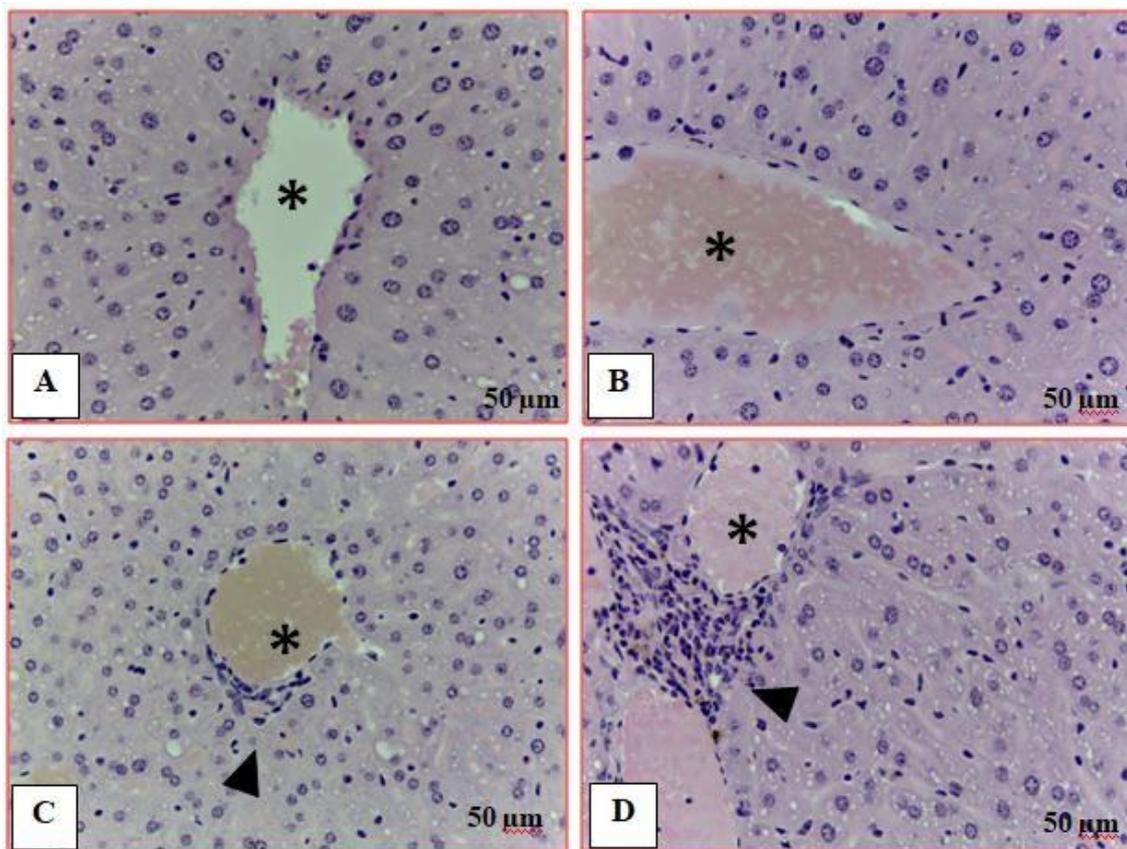
(A) Parênquima hepático e veia centro lobular bem preservados apesar da congestão aparente da veia (asterisco); (B) Congestão da veia centro lobular (asterisco) e desorganização dos cordões de hepatócitos no parênquima (setas); (C) Congestão da veia centro lobular (asterisco) e reação inflamatório focal discreta (cabeças de seta); (D) Infiltrado inflamatório discreto (cabeça de seta) e congestão da veia centro lobular (asterisco).

Figura 13. Fotomicrografias dos rins de camundongos fêmeas dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM9 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).



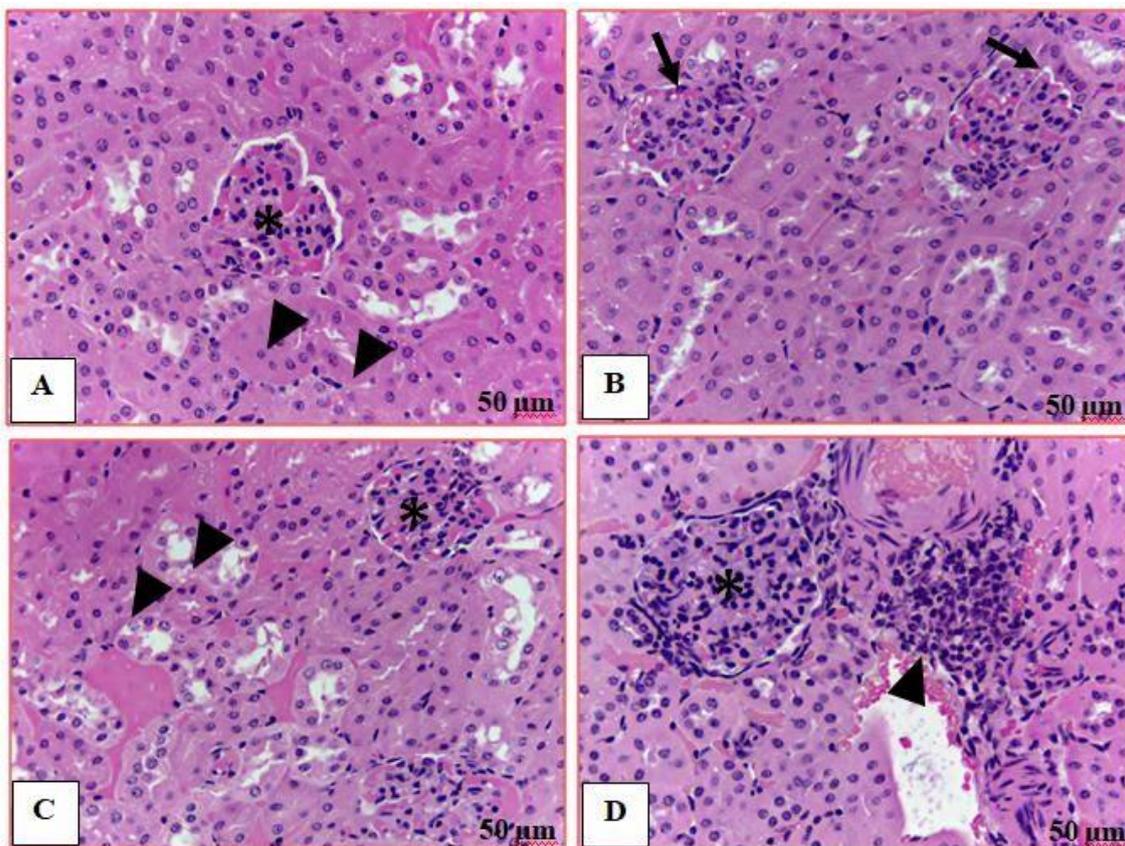
(A) Epitélio simples cúbico dos túbulos contorcidos e glomérulo bem preservados (asterisco); (B) Redução do espaço capsular (asterisco) e capilares congestionados (setas tracejadas); (C) Degeneração leve do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (setas), redução do espaço capsular (cabeça de seta), capilares congestionados (setas tracejadas) e aumento do glomérulo (asterisco); (D) Degeneração moderada do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (setas), redução do espaço capsular (cabeça de seta), capilares congestionados (seta tracejadas) e hiper celularidade glomerular (asterisco).

Figura 14. Fotomicrografias do fígado de camundongos machos dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM11 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).



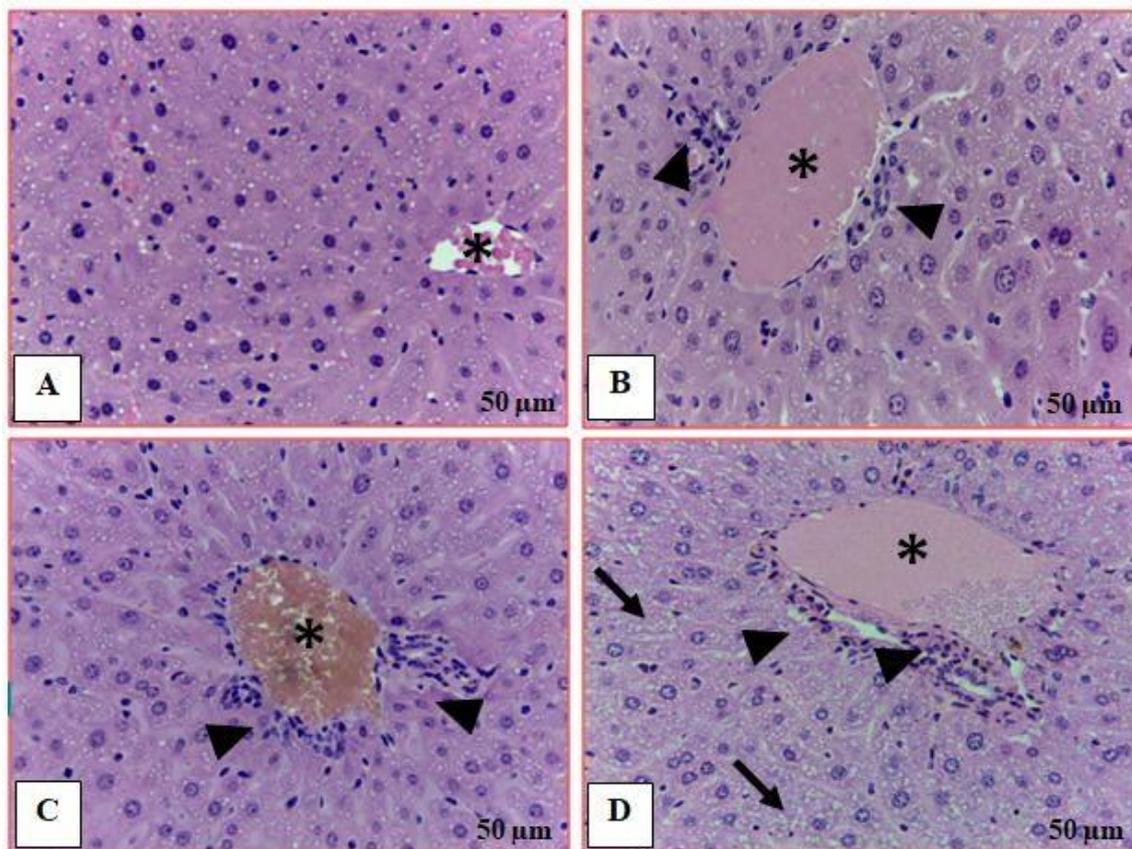
(A) Parênquima hepático e veia centro lobular bem preservados; (B) Congestão da veia centro lobular (asterisco); (C) Congestão da veia centro lobular (asterisco) e reação inflamatório focal discreta (cabeça de seta); (D) Infiltrado inflamatório moderado (cabeça de seta) e congestão da veia centro lobular (asterisco).

Figura 15. Fotomicrografias dos rins de camundongos machos dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM11 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).



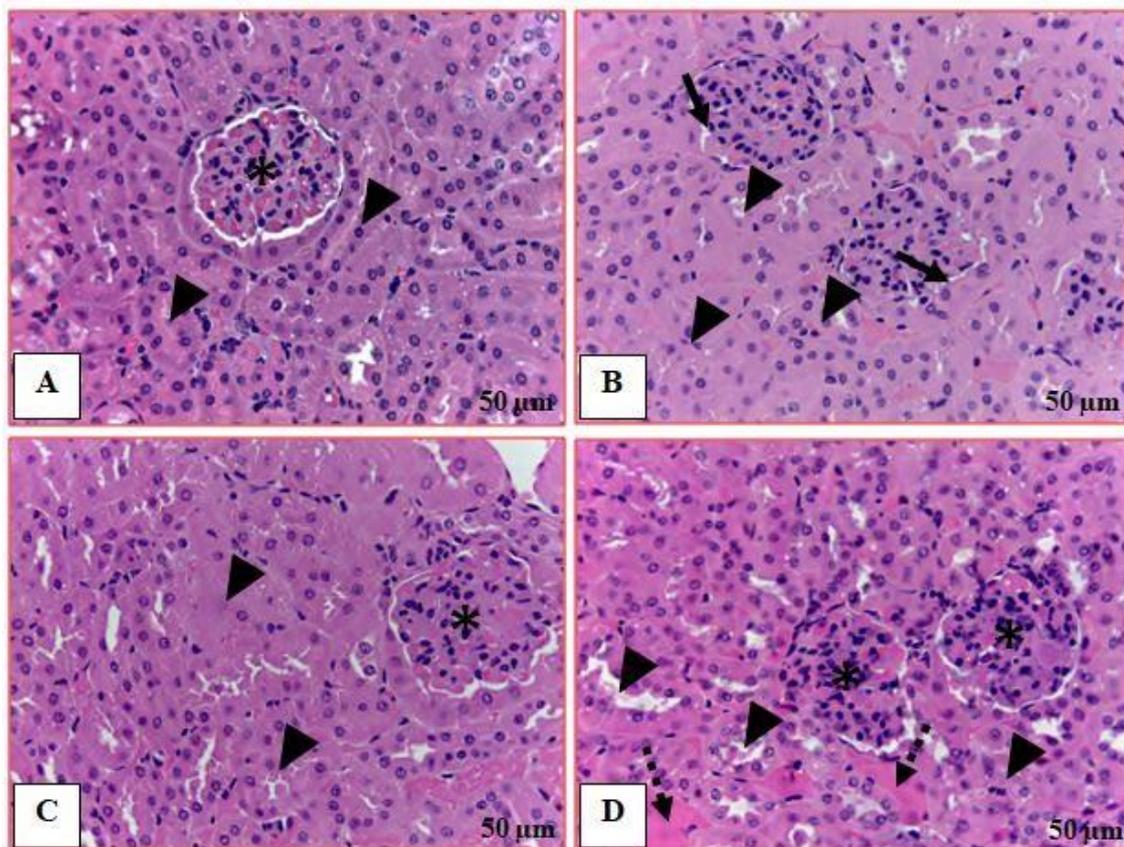
(A) Epitélio simples cúbico dos túbulos contorcidos (cabeça de seta) e glomérulo bem preservados (asterisco); (B) Redução do espaço capsular (setas); (C) Desorganização do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeças de seta) e da redução glomerular; (D) Infiltrado inflamatório (cabeça de seta) e glomérulo aumentado indicando possivelmente glomerulonefrite (asterisco).

Figura 16. Fotomicrografias do fígado de camundongos fêmeas dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM11 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).



(A) Parênquima hepático e veia centro lobular bem preservados; (B) Congestão da veia centro lobular (asterisco) e reação inflamatório focal discreta (cabeça de seta); (C) Congestão da veia centro lobular (asterisco) e reação inflamatório focal discreta (cabeça de seta); (D) Infiltrado inflamatório moderado (cabeça de seta); congestão da veia centro lobular (asterisco) e aparente esteatose microvesicular (seta).

Figura 17. Fotomicrografias dos rins de camundongos fêmeas dos grupos controle (A) e grupos experimentais que receberam LpQM11 nas doses de 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) e 300 mg/kg (D).



(A) Epitélio simples cúbico dos túbulos contorcidos e glomérulo bem preservados; (B) Desorganização do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeças de seta), além da redução do espaço capsular (setas tracejadas); (C) Degeneração leve do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeças de seta) e redução do espaço capsular (asterisco); (D) Degeneração moderada do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeça de seta), capilares congestionados (setas tracejadas) e hiper celularidade leve nos glomérulos indicando possivelmente glomerulonefrite (asterisco).

6 DISCUSSÃO

Apesar da sua relevância, a doença de Chagas não conseguiu despertar grande interesse das indústrias farmacêuticas e do meio acadêmico, como relatado por Ferreira (2012). Apesar disso, os estudos sobre essa doença vêm avançando, sobretudo após o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* que permitiu a identificação de vários alvos biológicos para o desenvolvimento de novas drogas (MOREIRA, 2009).

Du e colaboradores (2002) descreveram alguns derivados tiossemicarbazônicos capazes de inibir a proteína cruzaina e ainda possuíam atividade tripanocida *in vitro*, frente a células de mamíferos infectadas. Este estudo estabeleceu bases importantes para pesquisas de estrutura-atividade de compostos anti-Chagásicos. Posteriormente, Lima Leite e colaboradores (2006) relataram que compostos da classe das 4-tiazolinonas foram ativos contra *T. cruzi* em ensaios *in vitro* e não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas.

Baseado nesses estudos, Oliveira Filho e colaboradores (2015) realizaram um planejamento estrutural para a síntese de compostos inéditos derivados de 4-tiazolidinonas, bem como sua avaliação farmacológica e *docking* molecular. Os resultados demonstraram que os protótipos, denominados LpQM9 e LpQM11, obtiveram uma maior afinidade pela enzima cruzaina e ainda apresentaram atividade tripanocida frente as formas epimastigota e amastigota do parasito, se estabelecendo como promissores candidato à fármacos anti-Chagásicos.

A avaliação toxicológica é a medida da capacidade de determinado composto de causar quaisquer lesões, seja ela local ou sistêmica. Nenhuma substância está livre de causar efeitos adversos, no entanto, devem ser estabelecidos os níveis de segurança para a sua administração. Sendo assim, durante o desenvolvimento de novos fármacos, os testes de toxicidade são de fundamental importância (OGA, 2014).

Neste estudo, os compostos LpQM9 e 11 não produziram quaisquer sinais de toxicidade ou morte nos animais durante o período de observação e

ainda não ocorreu nenhuma alteração significativa no consumo de massa, água ou ração, no experimento de toxicidade aguda. Sendo assim, a DL_{50} não pôde ser estimada e é possivelmente superior a 1,0 g/kg, o que sugere inicialmente baixa toxicidade.

O ganho ponderal de massa corpórea e o consumo de água e ração, são importantes índices da saúde geral do animal, sendo assim, a diminuição destes parâmetros durante a administração de um composto, são fortes indicadores de toxicidade (JAHN e GÜNZEL, 1997).

A administração oral das doses repetidas dos compostos testados, LpQM9 e LpQM11, em camundongos de ambos os sexos não causou nenhuma morte ou quaisquer sinais que indique toxicidade. Em relação consumo de água, ração e ganho de massa, também não foram alterados, no entanto, foi possível observar um aumento no consumo de ração e ganho de massa em camundongos machos que receberam as doses de 30 e 100 mg/kg do grupo LpQM11. Provavelmente, estes fenômenos estão relacionados.

Sendo assim, pode-se considerar que os protótipos apresentam baixa toxicidade sistêmica, evidenciado pela baixa influência nos parâmetros ponderais dos animais testados.

O estudo das alterações hematológicas é importante para revelar efeitos adversos causados por xenobióticos, além disso, por meio desta avaliação em animais, é possível prever efeitos tóxicos em humanos (OLSON et al., 2000).

Em relação aos parâmetros hematológicos, apesar das alterações pontuais que ocorreram nos animais e ambos os sexos que receberam o LpQM9 (CHCM, RDW, número de plaquetas e bastões) e LpQM11 (Número de plaquetas, bastões e linfócitos), essas diferenças se encontram dentro do intervalo de referência para a espécie (HARKNESS et al., 2010), logo, pode-se sugerir que não ocorreram efeitos tóxicos hematológicos relacionados com a administração dos compostos em estudo.

No que diz respeito aos parâmetros bioquímicos, também houve alterações significativas nos animais que receberam os dois compostos, no entanto, também foram consideradas pontuais e estão dentro do intervalo de

referência para a espécie (HARKNESS et al., 2010), sendo assim, são consideradas de pouca relevância clínica.

A avaliação da massa absoluta e relativa dos órgãos dos animais que receberam o LpQM9 não apresentou nenhuma alteração nos machos, no entanto, nas fêmeas, permitiu observar poucas alterações como o aumento da massa percentual dos pulmões nas duas maiores doses e diminuição percentual das adrenais em todas as doses administradas.

Nos animais que receberam o LpQM11, também se observou alterações nas massas nos animais machos que receberam a dose de 300mg/kg, sendo as massas percentuais do coração, pulmão, fígado e rins e a massa absoluta do fígado aumentadas, em comparação ao grupo controle. A dose de 30 mg/kg também induziu alterações, provocando um aumento na massa absoluta das adrenais, enquanto a dose de 100 mg/kg não apresentou diferenças.

Estes fenômenos devem ser investigados mais profundamente, visto que, podem indicar alguma complicação local. No entanto, isoladamente não apresentam relevância clínica, devendo, portanto, ser associados aos resultados apresentados pelas análises bioquímicas e morfológicas.

No exame morfológico macroscópico, não foram observados quaisquer sinais anormais e/ou alterações na cor, textura nos órgãos analisados. Porém, no estudo morfológico microscópico hepático e renal, foram observadas algumas alterações nos camundongos de ambos os sexos que receberam os protótipos, como podem ser observadas nas figuras de 10 a 17.

A investigação da morfologia microscópica hepáticas dos animais que receberam o protótipo LpQM9, revelaram uma congestão da veia centro lobular em ambos os sexos e ainda discreto infiltrado inflamatório nos machos e desorganização dos cordões hepatócitos e uma reação inflamatória no fígado das fêmeas. No entanto, nenhum marcador bioquímico ou alterações de massa foram observados em todos os grupos, indicando que apesar das alterações encontradas, não ocorreu comprometimento da função hepática.

Na análise dos fígados provenientes dos animais dos grupos que receberam o LpQM11, pode-se observar alterações similares as do grupo

anterior em ambos os sexos, tais como congestão da veia centro lobular e infiltrado inflamatórios, além disso, as fêmeas do grupo de maior dose apresentaram uma esteatose microvesicular, o qual indica um sinal de regeneração celular. Como comentado anteriormente, os machos do grupo de 300 mg/kg apresentaram um aumento percentual e absoluto na massa do fígado e ainda a avaliação bioquímica revelou um aumento na enzima GGT em todos as dosagens.

As congestões lobulares não são específicas para dano no fígado, podendo indicar uma lesão pré ou pós-hepática (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2017; GARTNER, 2017). Apesar do aumento da enzima GGT, é importante salientar que esta enzima não é específica para o fígado, estando presente em outros órgãos, como a bile. Sendo assim, seu aumento isolado não indica que houve, necessariamente, uma lesão hepática, pois se assim houvesse, as transaminases (AST e ALT) também se mostrariam aumentadas.

O estudo da microscopia renal dos animais machos do grupo LpQM9 apresentaram algumas alterações significativas, como desorganização do epitélio colunar, congestão vascular, redução do espaço capsular e hiper celularidade, nas fêmeas foi possível observar além da congestão vascular, uma degeneração do epitélio simples. Apesar disto, marcadores bioquímicos ou alterações na massa dos rins não foram observados. Logo, pode-se sugerir que a administração deste protótipo em diferentes doses, por 28 dias consecutivos, não foi capaz de interferir na função renal.

A análise morfológica da microscopia renal dos machos do grupo LpQM11 revelou alterações como redução do espaço capsular, desorganização do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos e ainda um infiltrado inflamatório. Além disto, como colocado anteriormente, observou-se um aumento na massa percentual dos rins dos camundongos machos que receberam a maior dose. Nas fêmeas, observou-se que além de redução do espaço capsular e desorganização do epitélio simples colunar dos túbulos distorcidos, uma degeneração do epitélio simples colunar, capilares congestionados e hiper celularidade.

Estudos revelaram que algumas drogas podem induzir uma injúria renal cuja patogenia está associada com reações inflamatórias locais (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2017; GARTNER, 2017). Sendo assim, os resultados podem estar associados com os infiltrados inflamatórios e hiper celularidades encontrados, além disto, apesar do estudo morfológico ter revelado sinais de danos e regeneração celular, os exames bioquímicos não apresentaram azotemia, ou seja, o aumento sérico dos compostos nitrogenados (ureia, creatinina, proteínas e ácido úrico), cuja alteração está diretamente relacionada com o comprometimento renal.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode-se sugerir que os protótipos LpQM9 e LpQM11 apresentam baixa toxicidade quando administrados por via oral em camundongos Swiss de ambos os sexos, nas condições experimentais utilizadas. Sendo assim, podem ser considerados anti-Chagásicos promissores e devem ser testados em outras espécies animais para ratificar a baixa toxicidade e quiça seguir para futuros ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. L., TEIXEIRA, A.A.C., WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Histopathological analysis of the small intestine of pregnant rats exposed to sub lethal doses of herbicides and treated with melatonin. **Experimental Pathology Health Science**, v.6, p.63, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, DF, 31 jan. 2013 – Versão 2.
- BRASIL. Ministério da saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME/** Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos estratégicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Chagas Disease, 2012. Disponível em CDC: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/index.html>. Acesso em 20 de Dezembro de 2017.
- COURA, J. C. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.112, p. 113, 2007.
- DEAVALL, D.G.; MARTIN, E.A.; HORNER, J.M.; ROBERTS, R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. **Journal of Toxicology**, 2012.
- DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **Journal of Medical Chemistry**, v.45 (13), p.2695-2707, 2002.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMA, 2001. **Guideline on repeated dose toxicity**. Disponível em: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf. Acesso em: 27 de dezembro de 2017.
- FERREIRA, R.; FRADICO, J. R. B.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; SRIVASTAVA, R. M.; PEREIRA, V.; SOARES, M. B. P. S.; LEITE, A. C. L. L. Structural Investigation of Anti-Trypanosoma cruzi 2-Iminothiazolidin-4-ones allows the Identification of Agents with Efficacy in Infected Mice. **Journal of Medical Chemistry**, v.55 (24), p.10918-10936, 2012.
- FIOCRUZ. Disponível em: <http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=109&sid=7> Acesso em: 20 de Dezembro de 2017.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Guidance for Industry -Single Dose Acute Toxicity for Pharmaceuticals. Maryland: 1996. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079270>. Acesso em: 20 de Dezembro de 2017.
- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- HARKNESS, J.E.; TURNER, P.V.; VANDEWOUDE, S.; WHELER, C.L. **Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents**. 5th ed., Wiley-Blackwell, Iowa, USA, 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. **Guidance on Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use**. Geneva: 2011. Disponível em: <
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf. Acesso em: 27 de Dezembro de 2017.

JAHN, A.I.; GÜNZEL, P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment. **Reproductive Toxicology**, v.11, n.2/3, p.171-178, 1997.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

LABORATÓRIO FARMACÊUTICO PERNAMBUCANO – LAFEPE. **Lafepe produzirá Benzonidazol**. Disponível em:
<http://www.lafepe.pe.gov.br/noticias/lafepe-produzira-benzonidazol>. Acesso em: 27 de Dezembro de 2017.

LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NOBREGA, G. E.; MIRANDA, A. Chagas' Disease: A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. **Circulation**, v.14, n.6, p.1035-1060, 1956.

LIMA LEITE, A. C.; LIMA, R. S.; MOREIRA, D. R. M.; CARDOSO, M. V. O.; BRITO, A. C. G.; SANTOS, L. M. F.; HERNANDES, M. Z.; KIPERSTOK, A. C.; LIMA, R. S.; SOARES, M. B. P. Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14 (11), p.3749-3757, 2006.

LIMA, L.B.; VASCONCELOS, C.F.B.; MARANHÃO, H.M.L.; LEITE, V.R.; FERREIRA, P.A.; ANDRADE, B.A.; ARAÚJO, E.L.; XAVIER, H.S.; LAFAYETTE, S.S.L.; WANDERLEY, A. G. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.126, p. 468-473, 2009.

MALONE, R.A. Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. In: Warner, H., Wolf, P. (Eds.), **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Berlin: Springer-Verlag, p. 24–53, 1977.

MARIN-NETO, J.A.; RASSI, A.J.R.; MACIEL, B.C.; SIMOES, M.V.; SCHMIDT, A. Chagas heart disease. In: Yusuf, S.; Cairns, J.A.; Camm, A.J.; Fallen, E.L.; Gersh, B.J. eds. **Evidence-based cardiology**, 3 ed. edn. London: British Medical Journal (BMJ) Books, 823–41, 2010.

MIDEN PICTURES, 2017. Disponível em:
<https://www.mindenpictures.com/search?s=triatoma>. Acesso em: 12 de Dezembro de 2017.

MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. **Current Drug Targets**, v.10, p.212, 2009.

OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). **Draft OECD guideline for the testing of chemicals. Guidance no. 407. Repeated Dose 28 – Day Oral Toxicity Study in Rodents**, Adapted October 16, 2008. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9740701e.pdf>

OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). **Draft OECD guideline for the testing of chemicals. Guidance no. 421.**

Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, Adapted July 28, 2015. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9715241e.pdf>

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) - **Guidelines for the Testing of Chemicals. Carcinogenicity Studies (451)**, 1981. Disponível em: <http://www.oecdilibrary.org/docserver/download/fulltext/9745101e.pdf?expires=1318537762&id=id&accname=freeContent&checksum=F1EA4C94AED7D2F8244A8A3EE70CC004>. Acessado em: 20 de Dezembro de 2017.

OGA, Seizi. *Fundamentos da Toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 2014. 515p.

OLIVEIRA FILHO, G.; DE OLIVEIRA CARDOSO, M.; ESPÍNDOLA, J.; FERREIRA, L.; DE SIMONE, C.; FERREIRA, R.; COELHO, P.; MEIRA, C.; MAGALHAES MOREIRA, D.; SOARES, M. AND LIMA LEITE, A. Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of 4-hiazolidinones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.23, p.7478-7486, 2015.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; VAN DEUN, K.; SMITH, P.; BRUCE BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 56-67, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 15 de Dezembro de 2017.

PAL, U.S.; SHIRSAT, M.K.; SINGHVI, I. J.; VERMA, M.; SHAH, N. Chaga Disease. **American Journal of Pharmtec Research**, v.1, p.88-101, 2011.

PÉREZ – MOLINA, J.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, 391(10115), p.82 – 94, 2017.

PEREZ-MOLINA, J.; PEREZ-AYALA, A.; MORENO, S.; FERNANDEZ GONZALEZ, M.; ZAMORA, J.; LOPEZ-VELEZ, R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.64(6), p.1139-1147, 2009.

RASSI, A.J.R.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. **The Lancet**, v.375, p.1388–402, 2010.

RASSI, A.J.R.; RASSI, S.G.; RASSI, A.G.; et al. Sudden death in Chagas disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.76, p.75–96, 2001.

SANTOS FERREIRA, C.; AMATO NETO V.; GAKIYA, E.; BEZERRA, R.C.; ALARCÓN, R.S. Microwave treatment of human milk to prevent transmission of Chagas disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45 (1), p.41–42, 2003.

SOSA ESTANI, S.; Segura, E. L. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina. **Current Opinion Infectious Diseases**, v.19, p.583–587, 2006.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R.; Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 495-501, 2003.